

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. E. Küster

Zur Kenntnis der
mikrobiellen Keratinabbauprodukte
und deren physiologische Wirkungen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Umweltsicherung
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dipl.-Ing. agr. Mohamed Said Ali Safwat
geboren in Kairo/Ägypten

Gießen 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. E. Küster

Zur Kenntnis der
mikrobiellen Keratinabbauprodukte
und deren physiologische Wirkungen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Umweltsicherung
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl.-Ing. agr. Mohamed Said Ali Safwat
geboren in Kairo / Ägypten

Gießen 1974



Dekan: Professor Dr. H.-U. Preuße

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Küster

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Linser

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 12. 1974

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	4
1. Definition von Keratin	4
2. Die chemische Struktur von Keratin	5
3. Der Aufbau des Keratins	6
4. Der Abbau von Keratin	7
a) Chemische Hydrolyse	7
b) Biologischer Keratinabbau	9
5. Die Anwendungsmöglichkeiten und die physiologischen Wirkungen von keratinhaltigen Substanzen	14
III. MATERIAL UND METHODIK	15
1. Ausgangsmaterial	15
2. Chemische Methoden	16
A. Chemische Hydrolyse	16
B. Aminosäureanalyse mit Hilfe von:	
1. Aminosäureanalysator	16
2. Dünnschicht-Chromatographie	17
C. Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs und des Ammoniaks	19
D. Nachweis von Indolderivaten	19
E. Kohlenhydrat-Bestimmung	19
F. Leitfähigkeit	20
G. pH-Wert-Messung	21
3. Biologische Methoden	21
A. Isolierung von Mikroorganismen	21
B. Kulturverfahren	21
1. Schüttelkulturverfahren	22
2. Fermenterverfahren	23

	<u>Seite</u>
C. Sterilfiltration	23
D. Keimzahlbestimmung	24
E. Bioautographischer Versuch	25
F. Selbsterhitzungsversuche und Kompostierung	25
G. Die Herstellung von Extrakten	26
H. Keimversuch	27
I. Gefäßversuch	27
 IV. ERGEBNISSE	 29
A. Darstellung von Abbauprodukten	29
1. Chemische Hydrolyse	29
2. Biologischer Abbau durch Mikroorganismen	29
a) Isolierung und Beschreibung der Reinkulturen	34
b) Kompostierungsverfahren	43
B. Wirkung von Abbauprodukten auf:	
1. Mikroorganismen	54
a) In Reinkultur	55
b) In Mischkultur nach Kompostierung	57
2. Pflanzen	60
a) Gartenkresse	60
b) Sonnenblumen	70
 V. DISKUSSION	 84
 VI. ZUSAMMENFASSUNG	 96
 VII. LITERATURVERZEICHNIS	 99
 VIII. ANHANG	 107

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Haare, Hörner, Hufe, Klauen, Nägel, Federn, Igelstachel sowie Wolle und die obersten Schichten der Hautepidermis (Stratum corneum) bestehen zu einem überwiegenden Teil aus den unter natürlichen Bedingungen sehr widerstandsfähigen K E R A T I N E N.

Die zunehmende Massentierproduktion und die Entstehung von Großschlächtereien mit den nachfolgenden Verarbeitungsbetrieben führt zu einer örtlichen Konzentration von keratinhaltigen Abfällen, die nur bedingt ohne finanziellen Verlust vermarktet werden können. Es stellt sich die Frage: Wohin mit den umweltbelastenden keratinhaltigen Abfällen?

Da derartige hochmolekulare organische Stoffe von höheren Pflanzen nicht verwertet werden können, müssen sie mineralisiert, d.h. wieder in die anorganische Form überführt werden. Der moderne Gärtner verwendet Tierkörpermehl bzw. Gemische aus Horn und Knochenmehl als spezielle Düngemittel. Wenn heute trotz hoher Kosten anstelle von Mineraldüngung immer noch manche Sonderkulturen mit tierischen Abfällen gedüngt werden, so nicht aus Tradition, sondern aus der Überzeugung des Gärtners oder Weinbauers, damit bessere Erträge zu erzielen. Die zur Herstellung von Hornmehl, Horngrieß und Hornspänen benötigten Hörner, Hufe, Klauen, Walbarten und Hornabfälle stammen in erster Linie aus Großschlachthöfen, Häute- und Fellverarbeitungsbetrieben oder werden direkt beim Metzger gesammelt. Die Abfälle, die bei der Herstellung von Knöpfen und Kämmen aus Hörnern und Klauen anfallen, werden ebenfalls zu Düngemitteln vermahlen. Die in der Lederindustrie anfallenden Abfälle werden durch sehr starkes Erhitzen mit heißem Wasserdampf unter hohem Druck behandelt und anschließend auf Darren geröstet und zerkleinert.

Nach diesem Prozeß können die enthaltenen Nährstoffe von den Pflanzen leichter aufgenommen werden. Die bei der Aufbereitung von Haaren in der Filz- und Tuchindustrie entstehenden Haarabfälle sind nach einem Vermahlungsvorgang stickstoffreiche Komponenten für organische oder organisch mineralische Mischdünger.

Die auf Schlachthöfen, bei Metzgereien und Hausschlachtungen anfallenden Schweineborsten geben im Gemisch mit gemahlenem Horn, Hufen, Kompost und Stallmist ein wertvolles Düngemittel, das bei biologisch-dynamischer Wirtschaftsweise bevorzugte Anwendung findet. Auch Federn und deren Abfälle in den federnverarbeitenden Industrien enthalten den Stickstoff ebenso wie die besprochenen Keratinsubstanzen in einer schwer zersetzbaren Form. Ungemahlene Federn sind auch für den Kompost kaum geeignet, dagegen zersetzen sich Federmehl und -staub besser. Wollabfälle werden in einigen der oben genannten Mischdüngern als Wollschlamm mitverarbeitet. Die Wollwäschereien und Kämmereien geben gemahlenen Wollschlamm Dünger mit 3 % N ab. Der Federdünger "Leguma" (Fa. Ulrich u. Schulmeister, Klm) enthält in der Gehaltsanalyse 75 % organische Substanz und 12 % Gesamt-Stickstoff. Dieser Dünger wird in der vorliegenden Arbeit für das Kompostierungsverfahren als Ausgangsmaterial und für die Isolierung von keratinabbauenden Mikroorganismen verwendet. Durch die Massentierproduktion, sowohl in der Industrie wie auch neuerdings in der Landwirtschaft, entstehen oftmals Nebenprodukte, die die Umwelt belasten.

Es ist eine wichtige Aufgabe der Wissenschaft, Wege für eine kostengünstige Beseitigung derartiger Nebenprodukte zu finden. Die keratinhaltigen tierischen Abfälle, wie Hühnerfedern, Schweineborsten, Wolle, Haare, Nägel, Klauen, sind als Futtermittel wertlos. Sie können jedoch durch verschiedene Behandlungsmethoden, die in dieser Arbeit kritisch untersucht werden, zu organischen oder organisch-mineralischen Düngemitteln mit besonderen pflanzenphysiologischen Wirkungen verarbeitet werden. Die Wirkung dieser Düngemittel auf die Pflanzen wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Über die physiologische Wirksamkeit solcher Düngemittel, insbesondere über das Auftreten von physiologisch aktiven Substanzen beim mikrobiellen Keratinabbau, ist noch wenig bekannt. Die Bearbeitung des Problems beginnt zunächst mit Untersuchungen über die charakteristischen Eigenschaften des Keratins und deren Veränderungen bei den verschiedenen Abbauvorgängen.

Das Schwergewicht der Arbeit liegt in erster Linie auf der methodischen Anwendung bisher nur wenig bekannter oder neuerer Analyseverfahren zur Isolierung von keratinabbauenden Mikroorganismen und zur Charakterisierung der einzelnen Keratinabbauprodukte. Dabei stand die Bearbeitung und Klärung folgender Fragen im Vordergrund:

1. Unter welchen Bedingungen werden keratinhaltige Abfälle mikrobiell abgebaut?
2. Isolierung von keratinabbauenden Mikroorganismen.
3. Abbauaktivitäten der isolierten Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung der thermophilen Arten.
4. Welche Aminosäuren werden beim chemischen und mikrobiellen Abbau des Keratins freigesetzt, qualitativ und quantitativ?
5. Entstehen beim mikrobiellen Keratinabbau neben Aminosäuren noch weitere Zwischenprodukte?
6. Welche Keratin-Abbauprodukte zeigen neben einer Nährstoffwirkung einen weiteren physiologisch aktiven Effekt?
7. Welche Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich für keratinhaltige Abbauprodukte?

Es ist bekannt, daß die Beliebtheit der keratinhaltigen Düngemittel im Gartenbau vorrangig auf der Wirkung bestimmter Keratinabbauprodukte beruht. Es handelt sich hierbei meist um eiweißhaltige Stoffe, welche auf die Lebensvorgänge von Menschen, Tier und Pflanzen Einfluß nehmen. Die verursachten Effekte können je nach Pflanzenart und Dosis sowohl positiv als auch negativ sein.

Die Wirkungen sind denen von Wachstumsstoffen teilweise ähnlich. Prinzipiell können diese Stoffe sowohl über die Wurzeln als auch über oberirdische Teile in die Pflanzen eindringen, jedoch ist die Aufnahme durch Blatt und Stengel unbedeutend, so daß sich die Untersuchungen auf die Aufnahme durch die Wurzeln beschränken.

Eine wichtige Aufgabe ist die Erforschung der Anwendungsmöglichkeiten in der Praxis, um die wachstumsfördernde und bodenverbessernde Wirkung der Keratinabbauprodukte auszunützen.

Aus diesem Grunde wurde ein Gefäßversuch mit Sonnenblumen, ein Keimtest mit Gartenkresse, Versuche mit Testmikroorganismen im

bioautographischen Verfahren durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Klärung der oben stehenden Fragen liefern.

II. LITERATUR-ÜBERSICHT

1. Definition von Keratin

Nach GODDARD & MICHAELIS (1935), DOBBS (1964) und PAULIN (1968) gehört Keratin zu den komplizierten hochmolekularen Eiweißkörpern, die die mechanische und chemische Widerstandsfähigkeit der Haut und Hautgebilde bewirken. Unter dem Begriff Keratin faßt man eine Gruppe von Proteinen der Epidermis zusammen, die einen hohen Anteil an Cystein enthalten und die im festen Zustand makroskopische Strukturen bilden, in denen die Peptidketten bis zu einem hohen Grad geordnet sind. Nach DE VRIES (1962) hängt die Festigkeit von Keratin von den Querverbindungen ab, die durch Cystinreste, Wasserstoffbrücken und Salzbindungen gebildet werden; nach deren Trennung wird das Keratin löslich. Es gibt eine große Anzahl verschiedener Keratine. LEBLOND (1951) unterscheidet hartes und weiches Keratin. Horn, Klauen und Hufe enthalten typische harte Keratine. Sie werden Eukeratin genannt. Auch Haare, Wolle und Federn werden zum harten Keratin bzw. Eukeratin gerechnet, sind aber in der Medulla und im inneren Kanal, wenn er vorhanden ist, mit weichem Keratin assoziiert. Die Faserkeratine sind sehr dehnbar: unter geeigneten Bedingungen können diese um mehr als das Doppelte gedehnt werden und nach Entfernen der Spannung wieder zu ihrer ursprünglichen Länge zurückkehren. ASTBURY & BEIGHTON (1961) haben gezeigt, daß sich dabei das Röntgenogramm reversibel verändert. Wie aus dem α - bzw. β -Röntgenogramm zu ersehen ist, bestehen native Haare aus α -Keratin und gedehnte Haare aus β -Keratin. Der Keratingehalt von Wolle und Federn liegt z. B. bei ca. 90 %. Ein Beispiel für weiches Keratin ist die ä-

Bere Schicht der Epidermis, wie sie etwa aus der verdickten Haut von Rindernasen gewonnen wird, oder die äußere Schicht der menschlichen Epidermis.

2. Die chemische Struktur von Keratin

Die Feinstruktur des Keratins wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskops und der Röntgenstrukturanalyse in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt. Nach DOBBS (1964) und KARLSON (1966) beruht die relativ hohe chemische Widerstandsfähigkeit und Stabilität des Keratins auf seiner räumlichen Molekülstruktur, besonders der α - und β -Formen, die die Bildung zahlreicher Wasserstoff- und Disulfidbrücken ermöglichen.

Das β -Keratin besitzt eine Faltblattstruktur. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Seiden-Fibroin, dessen Struktur sehr genau bekannt ist. Die Ketten liegen antiparallel (abwechselnde Richtung der CO-NH-Bindung). Für das gestreckte Haar, das gleichfalls das Röntgendiagramm des β -Keratin-Types liefert, ist eine Faltblattstruktur mit Parallelen, gleichgerichteten Ketten anzunehmen.

Grundstruktur für alle Proteine vom α -Keratin-Typ ist die α -Helix. Besonders gut untersucht ist die Wolle der Schafe, in dessen Struktur die natürlichen Fasern nicht einfach ein Bündel von α -Helices sind, sondern sie sind komplizierter aufgebaut. Zunächst sind zwei oder drei Helices zu einem "Seil" verdreht, elf solcher "Seile" bilden eine Proteinfibrille, wobei zwei Seile in der Mitte und neun außen herum liegen. Die Protofibrillen, die einen Durchmesser von etwa 70 Å haben, sind in eine Matrix-Substanz eingebettet. Nach ASTBURY (1940) lösen sich Keratine nicht in einem anorganischen oder organischen Lösungsmittel, wenn nicht vorher die Wasserstoffbrücken, Salzbindungen oder Cysteinbrücken abgebaut oder gespalten werden. Zur Stabilisierung von Keratin tragen am meisten die S-S-Brücken bei. Erst wenn diese mindestens teilweise gelöst sind, geht das Keratin ganz oder zum Teil leicht in Lösung.

3. Der Aufbau des Keratins

Nach MERCER (1961) und MATOLSY (1963) erfolgt die Keratinsynthese in den lebenden Zellen des Stratum granulosum. Nach komplizierten Transformationsprozessen liegen im Endstadium tote, meistens kernlose, mit massiven Keratinbündeln ausgefüllte verhornte Zellen vor. Nach ZIEGLER (1968) ist folgende Theorie der Biosynthese der Keratinmoleküle zur Zeit am besten experimentell untermauert.

In den enzymatischen und stoffwechsel-aktiven Stratum germinativum und Stratum spinosum erfolgt die eigentliche, zellständige Synthese der Proteine, von denen die zytoplasmatischen Tonofibrillen als schwach stabilisierte Vorläufer der Keratinmoleküle bewertet werden. In der Transitzone des Stratum granulosum vollziehen sich makromolekulare Umgruppierungen, die zuerst zur Bildung der Präkeratine führen. Dabei werden die schwefelarmen α -strukturierten Fibrillen in eine schwefelreiche amorphe Matrix eingebettet, deren Elektronendichte derjenigen der Fibrillen gleicht. Welche Menge der Zellproteine zu Präkeratinen transformiert wird, ist variabel und u. a. dem Einfluß von Hormonen, Vitaminen und ernährungsphysiologischen Bedingungen unterworfen. Als erste Stufe der Stabilisierung folgt unter Kupferkatalyse die Bildung von Disulfidbrücken, für die die Zysteinpositionen in den Molekülen entscheidend sind. Durch Assoziationen mit Phospholipiden, Cholesterin und Fettsäureestern werden die Präkeratine sekundär stabilisiert. Durch aktive Synaeresis und passive Austrocknung sinkt der Wassergehalt von 75 % auf 10 %. Unter solchen Bedingungen laufen keine Lebensprozesse mehr ab. In diesem Sinne ist die Keratinisation eine Art Denaturierung. Ein echtes biochemisches Problem der Keratinisation ist die Anreicherung der Keratinmoleküle mit organischem Schwefel. Nach älteren Ansichten wird Zystein in der zytologischen Phase aus Zellproteinen auf Keratine übertragen. Nach SAMMARTINO (zit. nach ZIEGLER, 1968) beruht die Schwefelakkumulation nur darauf, daß aus Keratinvorstufen Nicht-Schwefel-Aminosäuren abgesprengt werden, da die eigentlichen Keratinmoleküle weniger aliphatische Monoamino-mono-

Karbonsäuren enthalten als andere Proteine. GILLESPIE (1963) hat spezielle Untersuchungen über den Schwefelgehalt von α -Keratinen aus 11 verschiedenen keratinisierten Strukturen ausgeführt. Generell enthalten Hornkeratine weniger Schwefel als Haarkeratine, z. B. Schafhorn 1,8 %, Schafwolle 2,5 %. Jedoch kann der Schwefelgehalt von α -Keratin je nach Tierart und Ernährung in weiten Grenzen schwanken. Deshalb ist der Schwefelgehalt als Unterscheidungsmerkmal problematisch.

4. Der Abbau von Keratin

a) Chemische Hydrolyse

Werden keratinhaltige Substanzen mit verdünnten anorganischen Säuren oder Alkalien bei mäßiger Temperatur behandelt, so verändert sich die Substanz nur wenig, es tritt eine Teilhydrolyse ein. Behandelt man zum Beispiel menschliche Haare mit 2,2n NaOH, so ist bei 50°C die Faserstruktur nach weniger als 45 min völlig zerstört, bei 70°C dauert es 15 min.

Während CLAY et al. (1940) zur vollständigen Hydrolyse eine 10-stündige Behandlung mit 20 %iger = 6n HCl bei einer Temperatur von 124-127°C für notwendig halten, kochen LUCAS & BEVERIDGE (1940) das Haar nur 11 Std. lang mit 9n HCl, während FLESCH (1950) eine 24stündige Hydrolyse mit 2n HCl für ausreichend erachtet.

ZAHN (1951): Zur Stabilisierung von Keratin tragen am meisten die -S-S-Brücken bei. Wenn diese mindestens teilweise gelöst sind, geht das Keratin, ganz oder zum Teil, leicht in Lösung. Nach MERCER (1961) gibt es zwei Methoden, die Keratinsubstanz hydrolysieren können:

1. Reduktion

Die hauptsächlich wirksamen Reagentien, die zur Reduktion der S-S-Brücken von Keratin angewendet werden, sind Schwefelwasserstoff, Sulfide und Thioglykolsäure. Dabei bilden sich SH-Gruppen.

2. Oxydation

Auch oxydierende Reagentien können zur Lösung von Keratin verhel-

fen, z. B. Peroxysäuren, Peressigsäure, Perameisensäure, Permanganatwasserstoff, Peroxyd und Chlorbrom oder Chlordioxyd. Dabei bildet sich Cysteinsäure und das Produkte ist dann in schwach alkalischen Medien leicht löslich. Nach ALEXANDER et al. (1951) und ALEXANDER & HUDSON (1954) werden durch Behandlung mit verdünnten Mineralsäuren und Alkali bei mäßiger Temperatur die Keratine in verschiedener Weise verändert, während ihre Struktur durch konzentrierte Säuren (z.B. HCl und H_3PO_4) und Alkali wie z.B. NaOH völlig zerstört wird. Nach PAULIN (1968) enthält das Keratinmolekül 18 verschiedene Aminosäuren. Nach chemischer Hydrolyse der Keratinsubstanz sind folgende Aminosäuren nachzuweisen (Tab. 1).

Tabelle 1: Art und Menge von Aminosäuren in verschiedenen Keratinen (in %) (n. WARD & LUNDGREN (1954)).

Aminosäure	Schafwolle	Menschenhaare	Rinderhorn	Hühnerfedern
Glykokoll	5,2-6,5	4,1-4,2	9,6	7,2
Alanin	3,4-4,4	2,8	2,5	5,4
Valin	5,0-5,9	5,5-5,9	5,3-5,5	8,3-8,8
Leucin	7,6-8,1	6,4-8,3	7,0-8,3	7,4-8,0
Isoleucin	3,4-4,5	4,7-4,8	4,3-4,8	5,3-6,0
Phenylalanin	3,4-4,0	2,4-3,6	3,2-4,0	4,7-5,3
Prolin	5,3-8,1	4,3-9,6	8,2	8,8-10,0
Serin	7,2-9,5	7,4-10,6	6,8	10,2-14,0
Threonin	6,6-6,7	7,0-8,5	6,1	4,4-4,8
Tyrosin	4,0-6,4	2,2-3,0	3,7-5,6	2,0-2,2
Asparaginsäure	6,4-7,3	3,9-7,7	7,7-7,9	5,8-7,5
Glutaminsäure	13,1-16,0	13,6-14,2	13,8	9,0-9,7
Arginin	9,2-10,6	8,9-10,8	6,8-10,7	6,5-7,5
Lysin	2,8-3,3	1,9-3,1	2,4-3,6	1,0-1,7
Hydroxylisin	0,2	-	-	-
Histidin	0,7-1,1	0,6-1,2	0,6-1,0	0,3-0,7
Tryptophan	1,8-2,1	0,4-1,3	0,7-1,4	0,7
Cystin	11,0-13,7	16,6-18,0	10,5-15,7	6,8-8,2
Methionin	0,5-0,7	0,7-1,0	0,5-2,2	0,4-0,5

Bei den meisten Horngeweben sind 18 Aminosäuren vorhanden. Im Vergleich zu anderen Proteinen weist Keratin den relativ größten Gehalt an Cystin auf. Auch Serin und Arginin sind in größeren Mengen vorhanden. Da Methionin nur in sehr geringer Konzentration (1 %) auftritt, vermutet man, daß der meiste Schwefel im Keratin als Cystin vorliegt.

b) Biologischer Keratinabbau

Keratin gilt zwar im allgemeinen als ein biologisch schwer abbaubares Substrat, jedoch befinden sich unter den Larven einiger Insekten und unter den Bakterien, Streptomyceten und vor allem den Pilzen Spezialisten, die Keratine als ausschließliche Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle verwerten können. Nach LINDERSTROM-LANG & DUSPIVA (1935) erfolgt der Keratinabbau durch die Larven der Kleidermotte (*Tineola biseliella*) im Mitteldarm unter praktisch anaeroben Bedingungen bei pH 9 bis 10 durch ein keratinolytisches System, das aus einem reduzierenden Agens und spezifischen Proteinasen besteht. Diese Proteinasen werden durch SH-haltige Substanzen stimuliert und nicht wie bei anderen Fermenten gehemmt. EVERETT et al. (1962) haben den Abbau von Wollpartikeln durch proteolytische Enzyme bei verschiedenen pH-Werten in vitro untersucht. Lediglich das Handelspräparat Keratinase, wahrscheinlich ein angereichertes Rohenzym einer Proteinase aus Streptomyces fradiae, war bei pH 9,5 merklich keratinolytisch aktiv. Andere bakterielle Proteinase und Trypsin zeigten nur ein geringes Spaltungsvermögen, d. h. diese Enzyme bauten nur die Interzellularsubstanzen der Wolle ab. Der Keratinabbau ließ sich jedoch bei sämtlichen Enzymen durch stark reduzierende Chemikalien erheblich stimulieren. Nach Reduktion der Disulfidbrücken waren die Wollkeratine nicht mehr Proteinase-resistent. Bemerkenswert ist, daß die Keratinase aus Strept. fradiae durch Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen nur um 20 bis 30 %, Trypsin aber um 85 bis 100 % gehemmt wurden. Der Proteinase-Anteil der Keratinase hat also partiell andere biochemische Eigenschaften als Trypsin. Nach ALLEN (1953) und MULCOCK et al. (1965) sind Bacillus coagulans,

B. subtilis und B. strearothermophilus, in der Lage Wolle anzugreifen. FREY (1965) hat folgende keratinophile Mikroorganismen isoliert: Arthroderma tuberculatum, Entomophthora coronata, Anixiopsis stercoraria und Chrysosporium spec.. Alle sind in verschiedenen Keratinsubstanzen gefunden worden und besitzen die Fähigkeit, Keratin abzubauen. AJELLO (1953) hat 7 Arten der Gattung Microsporum (M. cooki, M. gypseum, M. vanbreuseghemi, M. nonum, M. audouini, M. canis, M. distortum) isoliert, die ihren C- und N-Bedarf aus der Keratinsubstanz decken können. McQUADE (1964) hat verschiedene Mikroorganismen untersucht und auf ihre Fähigkeit, Keratinsubstanz abzubauen, geprüft. Folgende Mikroorganismen sind befähigt, Keratin abzubauen:

Bakterien: Pseudomonas aeruginosa, B. pumilus, B. subtilis und B. megaterium.

Actinomyceten: Micromonospora sp., Strept. albus, Strept. griseus, Strept. cellulosa, Strept. diastaticus und Strept. hygroscopicus.

Pilzen: Chaetomium atrobrunneum, Ch. cochliodes, Ch. spirale, Fusarium oxysporum, F. solani, Helminthosporium sp., Curvularia brachyspora, C. falcata, Cladosporium herbarum, Botryodiplodia theobromae, Alternaria sp., Aspergillus fischeri, Asp. fumigatus, Asp. nidulans, Asp. parasiticus, Asp. ustus, Penicillium griseofulvum, Pen. piscarium, Gliocladium roseum, Ctenomyces mentagrophytes, Gymnoascus gypseum, Keratinomyces ajelloi, Metarrhizium brunneum, Acrostalagmus cinnabarinus und Myrothecium verrucaria. Außerdem gehören zu den keratinophilen Pilzen natürlich die Dermatophyten mit den Gattungen Microsporum, Trichophyton, Keratinomyces (Arthroderma) sowie teilweise die pathogenen Candida-Arten. VANBREUSEGHEM (1952, 1953) hat den entscheidenden Fortschritt bei der Klärung des mikrobiellen Keratinabbaus durch Mikroorganismen angebahnt. Denn erst die von ihm eingeführte Haarködermethode hat umfangreiche Versuchsreihen zum Nachweis von Dermatophyten und anderen Keratin-abbauenden Pilzen im Boden möglich gemacht. Seitdem sind in vielen Ländern entsprechende Untersuchungen durchgeführt und in allen Erdteilen auch bodenbewohnende Keratinabbauende Mikroorganismen gefunden worden. FISCHER (1959) konnte durch Pilzkulturen auf keratinhaltigen Nährboden nachwei-

sen, daß diese Skleroproteine als Hauptkohlenstoff- und Stickstoffquelle für Pilze geeignet sind. Nach PAGE (1950) ist ein enger Kontakt zwischen Keratin und Hyphen Voraussetzung für dessen Abbau. Im Gegensatz dazu haben EVOLCEANU & LAZAR (1960) gezeigt, daß Dermatophyten keratinolytische Enzyme ausscheiden können und somit ohne direkten Kontakt Haare abzubauen vermögen. Deshalb müssen die für den Bau- und Betriebsstoffwechsel notwendigen C-N-Verbindungen durch Enzyme, die von den Pilzen ausgeschieden werden, aus den Keratinen freigesetzt werden. EVOLCEANU & LAZAR (1960) trennten Keratinsubstanz und Pilze durch eine Watte-lage und stellten trotzdem eine Zersetzung von Wolle, Haare und Horn fest. Auch durch Actinomyceten, besonders thermophile Arten, wurde ein schneller Abbau der Rohwollfasern hervorgerufen. GREGORY & LACEY (1962) (zit. nach DYE 1964) berichteten von guten Isolierungsmöglichkeiten von thermophilen Aktinomyceten, die die Fähigkeit besitzen Wolle abzubauen. Die meisten der untersuchten Myxobakterien-Arten (MARTINS a. SO 1969) benutzen die autoklavierten Keratin-Substanzen als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Die am besten untersuchte Cytophagen-Art war in der Lage, ca. 80 % der autoklavierten Federn sehr schnell aufzulösen. Der Keratinabbau ist ein komplizierter physiologischer Prozeß, bei dem verschiedene Reaktionen miteinander gekoppelt sind. Über die Enzyme der keratinophilen Mikroorganismen sind bereits eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden. Nach ZIEGLER (1965) wurden in dem myzelfreien Kulturfiltrat von Dermatophyten, besonders Tr. mentagrophyton und M. canis, folgende Ektoenzyme nachgewiesen: Amylasen, Pektinase, Lipase, (Esterasen), Phosphatase, Proteinasen bzw. Peptidasen, und Keratinasen. Für die Zerstörung solcher Skleroproteide in Vivo sind außerdem zum Abbau der schützenden Fettfilme Lipasen (Esterasen) notwendig. Die Bestimmung der Aktivität und die Charakterisierung der Glieder des keratinolytischen Enzymkomplexes vermitteln Kenntnisse über Abbaumechanismen. Zweifellos besitzen diese Mikroorganismen eine enzymatische Ausrüstung, mit deren Hilfe Keratine durch völligen Um- und Abbau in den Stoffkreislauf der Natur einbezogen werden. Vor allem ist die Frage noch nicht endgültig zu beantworten,

ob Stämme von Strept. fradiae, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, Proteinasen besitzen, die natives Keratin unmittelbar angreifen, oder ob es sich hierbei um Hilfsenzyme oder physiologische Hilfssysteme handelt, die die Keratine denaturieren und den Keratinabbau erst einleiten. Einige Autoren sind der Ansicht, daß auch die Pilze, besonders die Dermatophyten, den Keratinabbau durch Reduktion der Disulfidbrücken einleiten und durch Proteinasen mit geringer Empfindlichkeit gegenüber SH-Verbindungen bei Redoxpotentialen von 200 mV vollziehen. Jedoch haben CHESTER & MATHISON (1963) bei Wollabbau durch K. ajelloi niemals ein Redoxpotential unter +100 mV gemessen und keine reduzierten Spaltprodukte der Keratine gefunden. Dabei veränderten die Pilze den pH-Wert der Nährlösung zum Alkalischen hin. Diese Alkalisierung beruht auf der Freisetzung von Ammoniak und führt zur Quellung der Keratine. Die genannten Autoren nahmen deshalb an, daß die Ektoproteinase der Dermatophyten die Keratine ohne primäre Reduktion der Disulfidbrücken angreifen können. WEARY & CAWLEY (zit. nach Ziegler 1968) halten ebenfalls die Reduktion als Primärangriff auf Keratine durch Dermatophyten nicht für notwendig. ZIEGLER (1968) erklärt zur Biochemie der Keratinolyse durch Pilze folgendes:

1. Die Pilze vollziehen im allgemeinen den Keratinabbau unter aeroben oder selten schwach anaeroben Bedingungen.
2. Die aktuelle Wasserstoffionenkonzentration wird dabei generell aktiv vermindert. pH-Anstieg und Keratinolyse verlaufen parallel. Die pH-Veränderungen werden durch die Freisetzung von Ammoniak verursacht. Die Ammoniak-Titer stehen in Korrelation zur Intensität der Keratinspaltung.
3. Die Pilze scheiden Proteinase bzw. eine Proteinasegruppe mit unterschiedlicher Affinität zu verschiedenen Proteinen (Gelatine, Kasein, Pepton, Keratinen) aus.
4. Der organische Schwefel der Keratine wird durch die Pilze bis zur Sulfatstufe oxadiert und in dieser Form ausgeschieden.

Unter Berücksichtigung aller jetzt vorliegenden biochemischen Untersuchungen zur Keratinolyse durch Pilze sind unter dem Begriff

Keratinase entweder reduzierende oder alkalisierende Prinzipien zu verstehen. Sie ermöglichen Proteinasen, wenn auch gewiß in unterschiedlichem Ausmaß, sekundär den Abbau von nativen Keratinmolekülen. Der totale Keratinabbau wird von lokalisierten Komponenten katalysiert. Der Abbau keratinisierter Strukturen durch Pilze verläuft in folgenden Etappen: 1. Durch verschiedene lipolytische Enzyme werden zuerst die Begleitlipide gelöst und partiell in den Stoffwechsel einbezogen.

2. Die aktive Alkalisierung des Milieus erfolgt durch Ammoniakausscheidung der Pilze. Durch oxydative Desaminierungen gewinnen die Pilze Energie, eliminieren den Stickstoffüberschuß des Substrates (Keratin 12 - 16 % N), überwinden das Alkalineutralisationsvermögen, also die Puffer-Kapazität des Substrates, stellen optimale Bedingungen für die Ektoenzyme her (Lipasen, Esterasen pH 7 - 8, proteolytische Enzyme pH 8 - 9) und lockern die Strukturen der Keratinmoleküle durch Öffnung der Salzbindung und nachfolgende Quellung. Die Alkalisierung ist eine der Schlüsselreaktionen der mikrobiellen Keratinolyse.

3. Insgesamt erleichtern diese Prozesse den Proteinase-molekülen das Eindringen in die Keratine. Die proteolytische Phase der Keratinspaltung führt zur Freisetzung niedermolekularer, offenbar permeabler Peptide.

4. Wahrscheinlich vorwiegend intrazellulär, vielleicht auch manchmal schon epizellulär, folgt die Reduktion der Disulfidbindung der Spaltprodukte und schließlich ihre Einbeziehung in den Aminosäure - Pool der Zellen. Der Schwefelüberschuß der Keratine wird durch Oxydation zu Sulfat eliminiert. In zahlreichen Untersuchungen der durch Pilze und Actinomyceten hydrolysierten Keratinsubstanz wurden folgende Aminosäuren identifiziert:

Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Prolin, Serin, Threonin und Valin. DANIELS (1953) fand im Kulturfiltrat von Mic. canis auf Haarkeratin außer den oben genannten noch Glykokoll, Histidin, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin. EVOLCEANU & LAZAR (1960) konnten dagegen in Haarkulturen mit verschiedenen Dermatophyten nur Alanin, Cystin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin und Valin nachweisen. Cystin, Asparagin-

säure, Glutaminsäure, Glykokoll, Threonin, Alanin, Lysin, Arginin, Tyrosin, Valin, Methionin, Leucin und Phenylalanin wurden von NOVAL und NICKERSON (1959) nach Einwirkung von Strept. fradiae auf Wolle nachgewiesen.

5. Die Anwendungsmöglichkeiten und die physiologischen Wirkungen von keratinhaltigen Substanzen

Über eine wachstumsfördernde Wirkung der Keratinabbauprodukte auf die Pflanzen besteht heute kein Zweifel mehr. Neben der reinen Nährstoffwirkung sind spezifische Einwirkungen auf den Stoffwechsel der Pflanzen festzustellen. In der verschiedensten Form werden keratinhaltige Substanzen im Handel angeboten. Je nach Art und Anteil der keratinhaltigen Abfälle weist z.B. Federmehl folgende Zusammensetzung auf:

Gesamtstickstoff	12,76 % (N)
Schwefel	2,48 % (S)
Phosphorsäure	0,13 % (P_2O_5)
Eisen	0,13 % (Fe)
Magnesium	0,062 % (Mg)
Mangan	0,0053 % (Mn)
Kupfer	0,0017 % (Cu)

Wie aus einer Veröffentlichung von BURGHARDT (1960) zu entnehmen ist, beeinflussen diese Düngemittel die Eiweißzusammensetzung und haben somit für die Qualität der Ernteprodukte besondere Bedeutung. Pflanzen, die mit keratinhaltigen Düngemitteln gedüngt werden, weisen oft höhere Gehalte an schwefelhaltigen Aminosäuren (Methionin, Cystein) auf. Es wird vermutet, daß durch die Anwendung derartiger Düngerformen in Acker- und Gartenbau zusätzliche Ertragsteigerungen erzielbar sind, die mit alleiniger Mineraldüngung nicht erreicht werden können. Außerdem ist bekannt, daß Düngemittel aus keratinhaltigen Abfällen die Bodenfruchtbarkeit, besonders die biologische Aktivität im Boden, anheben.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten folgende Substanzen:

A. Für die Isolierung der vorherrschenden Arten von Mikroorganismen mit Hilfe der Haarködermethode nach VANBREUSEGHEM (1952) wurde ein Gemisch aus Weißfedern und Hornspänen mit 14 % N angewendet. Die Federn wurden gründlich mit Leitungswasser, dann mit dest. H_2O gewaschen, danach mit 5 %iger Wofacutanlösung oder Fitlösung¹⁾ behandelt, erneut mit dest. H_2O gespült und danach mit einer Schere in kleine Teile geschnitten²⁾. Die zerkleinerten Federn wurden 2 - 3 Stunden in Chloroform getaucht, um die Fette zu entfernen, und unter Vakuum bei 60°C getrocknet. Die getrockneten Präparate wurden über P_2O_5 bis zur Benutzung aufbewahrt. Die Hornspäne wurden staubig fein gemahlen, gründlich mit Leitungswasser gewaschen und genau wie die Weißfedern weiter behandelt.

B. Mit Hilfe der entfetteten, fein gemahlenden Hornspäne wurde die Herstellung von Keratinabbauprodukten erleichtert. Die behandelten Hornspäne wurden verschiedenen C- und N-freien Nährlösungen zugegeben. Die Einwaage im Schüttelkulturverfahren betrug 100 mg pro 100 ml Nährlösung (NL) und im Fermenter 1 - 2 g pro Liter, später 5 - 10 g pro Liter.

C. Für die Kompostierungsverfahren diente ein Gemisch von Federmehl und Weißtorf nach Anfeuchten mit dest. H_2O als Ausgangsmaterial. Das Federmehl "Leguma" (Fa. Ulrich & Schulmeister, Ulm) wurde mit Weißtorf gemischt und für die Kompostierungszwecke verwendet. Da es als Stickstoffdünger geeignet ist und etwa den natürlichen Verhältnissen entspricht, wurde dieses Federmehl als gutes kompostierbares Material ausgewählt.

1) Fitlösung (VEB Fettchemie-Karl Marx-Stadt)
Wofacutan-Lösung (VEB Chemiekombinat-Bitterfeld)

2) Wofacutan- bzw. Fitlösung sind seifenhaltige Reinigungsmittel

2. Chemische Methoden

A. Chemische Hydrolyse

Zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren muß eine vollständige Hydrolyse von Keratin durchgeführt werden. Das Keratin-Material in Form von Haaren, Federn, Hornspänen und Wolle wurde gründlich mit Fitlösung oder 5 %iger Wufacutanlösung gereinigt, mit dest. Wasser gewaschen, mehrmals zur Entfettung mit Chloroform behandelt und schließlich bei 60 - 70°C im Vakuum getrocknet. Um eine erneuter Wasseraufnahme zu verhindern, bewahrt man das Keratin am besten bis zur Analyse über P_2O_5 auf. Die Keratinhydrolyse folgt im wesentlichen einer Arbeitsvorschrift, wie sie im Inst. f. Makromolekulare Chemie, Abt. Eiweiss u. Leder, T.H. Darmstadt angewandt wird (Persönl. Mitteilung 1971).

25 ml Spitzkolben mit Schliff und zusätzlichem Sicherungsschluß wurden verwendet und 10 mg Protein in Form von entfettetem Federmehl in den Spitzkolben eingewogen; pro 1 mg Einwaage gibt man 1 ml 25 %ige HCl hinzu. Die Hydrolyse muß in Stickstoffatmosphäre ablaufen, dazu wird während drei Minuten N_2 in den Kolben geleitet. Anschließend wird das Federmehl 24 Stunden bei 105°C im Trockenschrank hydrolysiert. Das Abdampfen erfolgt sechsmal im Rotationsverdampfer bei 40°C unter Vakuum, um eine Zerstörung der Aminosäuren zu vermeiden. Das hydrolysierte Federmehl wurde zuerst getrocknet, dann fünfmal mit ca. 15 ml dest. H_2O gewaschen, wieder getrocknet und zuletzt in 5 ml Pufferlösung aufgelöst.

B. Aminosäureanalyse

1. Aminosäureanalysator

Nach der Auflösung des vorbereiteten Hydrolysates in Phosphat-Puffer wurde es in den Aminosäureanalysator eingegeben. Die aus den Ionenaustauschersäulen getrennten Aminosäuren wurden mit Ninhydrin angefärbt, im Durchflußphotometer gemessen und deren Extinktionskurven auf logarithmisches Papier aufgezeichnet. Später wurden die Aminosäuren quantitativ und qualitativ berechnet. Genauere Werte können nach der Methode von Stein und Moor unter

Verwendung des vollautomatischen BECKMANN-Spinco-Aminoacid-Analyzer erzielt werden. Hier beträgt der mittlere Fehler 3 - 5 %.

2. Dünnschicht-Chromatographie

Die Aminosäuren sollten möglichst frei von Begleitstoffen vorliegen. Für Kontroll- und Testversuche zum Vergleich von Rf-Werten usw. verwendet man reine, käufliche Aminosäuren. Dann bereitet man davon Lösungen mit einer Aminosäure-Konzentration von 0,1 %. Als geeignetes Lösungsmittel dient Wasser mit einem Zusatz von etwa 10 % Propanol. Solche Lösungen sind im Kühlschrank und selbst bei Zimmertemperatur ohne Veränderung 2 - 4 Wochen haltbar. Im allgemeinen werden 0,5 oder 1 ml entsprechend 0,5 oder 1 mg pro Aminosäure aufgetragen. Die schwerlöslichen Aminosäuren Tyrosin und Cystin erfordern als Lösungsmittel 0,1 n Salzsäure. Die Substanzproben werden in 10 - 100 μ l je nach Konzentrationen auf Dünnschichtplatten genau 15 mm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen. Zwei Methoden wurden für den Nachweis von Aminosäuren angewendet.

a. Auf DC-Fertigplatten Kieselgel (Merck) (ohne Fluoreszenzindikator) 20 x 20 cm mit Schichtdicke von 0,25 mm. Für die Entwicklung wurde die zweidimensionale Trennung angewandt (STAHL 1962).

Nach Auftragen des Hydrolysates werden die Platten mit Warmluft getrocknet und in eine Glaskammer gebracht.

1. Laufgemisch: 17 % Ammoniaklösung + Chloroform + Methanol
= 20 + 40 + 40.

Die Laufzeit in der ersten Richtung beträgt 5 Stunden, die Trocknungszeit 30 Minuten.

2. Laufgemisch: 75 % Phenol in H_2O bei 55°C im Trockenschrank aufgelöst. Die Laufzeit beträgt 15 Stunden, die Trockenzeit 3 Stunden. Die Platten werden mit Minhydrin (400 mg Ninhydrin + 1 ml Essigsäure + 90 ml Aceton) angefärbt. Danach erfolgt im Trockenschrank für 7 Minuten eine Erhitzung bei 60°C und eine weitere halbe Stunde bei 100°C, damit alle anderen Aminosäuren mit violetter Farbe deutlich erscheinen. Nach Abkühlung werden die Platten auf durchsichtige Platten mit Bleistift kopiert. Bei der Aus-

wertung werden zuerst die Rf-Werte ermittelt und danach die einzelnen Aminosäuren mit der Eichkurve verglichen. Um die verschiedenen Aminosäuren quantitativ zu bestimmen, werden die Flecken abgekratzt und mit einem feinen Haarpinsel vorsichtig in Reagenzgläser überführt. 1 cm^2 und 2 cm^2 gelten als Blindwert, um die Eichkurve herzustellen. 2 ml Äthylalkohol (75 %) werden dazugegeben, damit die Aminosäuren gut aufgelöst werden. Die Reagenzgläser werden 1 - 2 Stunden ins Dunkle gestellt, dann werden sie 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert, um die Reste von Kieselgel abzusetzen. Die Farbtintensität wird im Photometer gemessen und mit der Eichkurve verglichen. Schließlich werden die einzelnen Aminosäuren umgerechnet und in Tabellen zusammengestellt.

b. Zellulosefertigplatten O.F. (Merck 5716/0025) $10 \times 10\text{ cm}$ werden für eine zweidimensionale Chromatographie verwendet.

1. Laufgemisch: Pyridin + Dioxan + NH_3 + H_2O = 35 + 35 + 15 + 15. Das fertige Gemisch ist bei Raumtemperatur ein Jahr haltbar.

Zum Chromatographieren wird die Kammer täglich mit frischem Elutionsmittel gefüllt. Die Platte wird in der ersten Dimension zweimal entwickelt. Inzwischen werden sie im Trockenschrank 2 - 3 Minuten getrocknet.

2. Laufgemisch: n-Butanol + Aceton + Essigsäure + H_2O = 14 + 14 + 3 + 9. Da die Lösung verestert, ist das fertige Laufmittel nur 12 Stunden haltbar. Wegen der geringen Haltbarkeit mischt man die entsprechenden Anteile der Lösungen A 28 ml (n-Butanol 14 + Aceton 14) und B 12 ml (Essigsäure 3 + H_2O 9) unmittelbar vor Gebrauch. Die Lösungen A und B sind jede für sich ein Jahr haltbar. Die Platte wird in der zweiten Dimension zweimal entwickelt. Die Zwischentrocknung kann im Trockenschrank oder mit dem Föhn erfolgen. Die Laufhöhe beträgt in beiden Dimensionen 8,5 cm.

Nachweis: Mit dieser Methode werden die Aminosäuren qualitativ bestimmt. Die Platten werden nach dem Trocknen mit Ninhydrin behandelt, bis sie gleichmäßig feucht sind. Die Platten werden zunächst mit dem Föhn getrocknet, anschließend bei 80°C im Trockenschrank 2 - 3 Minuten erhitzt. Die meisten Aminosäuren tre-

ten als blaue Flecken mit maximaler Intensität auf. Eine weitere Erhitzung von 30 Min. bei 100°C bzw. 15 Min. bei 120°C läßt auch die übrigen Aminosäuren mit maximaler Intensität erscheinen. Diese Platten werden in der gleichen Weise ausgewertet wie die Kieselgelplatten.

C. Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs und des Ammoniaks

Der Gesamt-N-Gehalt wurde nach KJELDAHL ermittelt. Die Ammoniakbestimmung erfolgt nach der Vorschrift von BREMNER (1965). Ammoniak wurde mit MgO destilliert, in 15 ml 1n KCl-Lösung aufgefangen und in Borsäure titrimetrisch bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf mg umgerechnet.

D. Nachweis von Indolderivaten nach STAHL (1962)

Die besten Trennergebnisse werden auf den nach dem Standardverfahren hergestellten Kieselgel G-Schichten erhalten. Für die Bioautographie werden Zelluloseplatten 10 x 10 cm verwendet. Hiermit wird eine physiologische Wirkung der Abbauprodukte auf Mikroorganismen nachgewiesen. Als Laufmittel wurde Isopropanol - Ammoniak-Lösung 25 % - Wasser (85 + 5 + 25) benutzt. Die Laufzeit beträgt hierbei bis zu 2 Stunden. Man entwickelt aufsteigend in der Trogkammer bei Kammersättigung in einem abgedunkelten Raum. Die Substanzen werden 2 cm vom Plattenrand aufgetragen. Die Trennstrecken betragen 12 bis 15 cm. Als Reagenz wird 1 g Δ -Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ml Salzsäure (1,19) gelöst und die Lösung mit 50 ml Äthanol versetzt. Sofort nach der Entwicklung werden die Platten eingesprüht (etwa 10 ml pro 20 x 20 cm Fläche). Dann erwärmt man die Platten vor dem Besprühen 5 Min. bei 50°C.

Anschließend werden Königswasser-Dämpfe ($\text{HCl} : \text{H}_2\text{NO}_3 : 3 : 1$) über die Schicht geblasen.

E. Kolorimetrische Bestimmung der gesamten Kohlenhydrate nach NEISH (1952)

Reagenzien:

Anthron-Reagenz

2,0 g Anthronkristalle in 1 Liter 95 %iger Schwefelsäure lösen.

Glucose - Stammlösung

500 mg wasserfreie D-Glukose werden in Wasser gelöst und auf genau 250 ml aufgefüllt. Aufbewahrung im Kühlschrank!

Eichreihe

Glukosegehalt

a) 10 ml Glukose Stammlsg.	auf 100 ml auffüllen	in 4 ml	
		800	‰
b) 50 ml Verdünnung a	" 100 ml	"	400 "
c) 50 ml " b	" 100 ml	"	200 "
d) 50 ml " c	" 100 ml	"	100 "
e) 50 ml " d	" 100 ml	"	50 "
f) 50 ml " e	" 100 ml	"	25 "
g) 7,5 ml Glukose-Stammlsg.	" 100 ml	"	600 "
h) 50 ml Verdünnung	" 100 ml	"	300 "
i) 6,25 ml Glukose-Stammlsg.	" 100 ml	"	500 "
j) Kontrolle:	Wasser		0 "

Analyse

4 ml Zentrifugat werden in einem 50 ml Becherglas mit 8 ml Anthronreagenz aus einer Bürette unterschichtet. Anschließend umschütteln, 15 Min. stehen lassen, danach messen. Nach dem Umschütteln erhitzt sich die Mischung. Diese Reaktionswärme gehört zur Analyse. Die Färbung ist von der Erhitzung abhängig; deshalb soll weitestgehend die gleiche Temperatur erreicht werden. Messung: Entstandene Blaufärbung in einer 25 mm Küvette einem Filter von 540 mμ. messen.

F. Leitfähigkeitsmessung

Die Messung erfolgt mit einer Leitfähigkeitsmeßzelle und einem direkt anzeigenden Meßgerät (Methohm, WTW). Je größer die Ionenkonzentration einer Lösung, um so geringer ist der Widerstand der Lösung, und um so größer ist die Leitfähigkeit. Sie ist ferner temperaturabhängig. Sie wird gemessen zwischen zwei Elektroden von 1 cm² Fläche bei einem Abstand von 1 cm bei 25°C (S/cm, 25°C). Als Meßgrößen kommen in Betracht Millisiemens (ms = 10⁻³ S) und Mikrosiemens (us = 10⁻⁶ S). Die Messung der Leitfähigkeit erfolgte hauptsächlich in Extrakten von Torf-Federn-Gemisch, Fe-

dern und Torf nach Verrottung in bestimmten Zeitabständen, um die gelösten Keratinabbauprodukte zu messen.

G. pH-Wert-Messung

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration erfolgt in den Kulturfiltraten bei verschiedenen Abbaustufen sowie in Extraktion von Torf-Federn-Gemisch, Federn und Torf während der Kompostierungsvorgänge. Der pH-Wert wird elektrometrisch (Radiometer pH-Meßgerät) mit einer Glaselektrode gemessen. Im Fermenter wird während der Keratinabbauprozesse der pH-Wert registriert und automatisch kontrolliert (pH-Biotrol).

3. Biologische Methoden

A. Isolierung von Mikroorganismen

Um keratinabbauende Mikroorganismen zu isolieren, wird die Methode von VANBREUSEGHEM (1952) mit geringfügigen Veränderungen durchgeführt. 20 Petrischalen werden mit abgesiebttem und getrocknetem Gartenboden 2 mm gefüllt und mit dest. H₂O angefeuchtet, dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt und mit Keratinköder versehen. Als Köder dienten Gemische aus Hornspänen und Federn. Die Beobachtungen einer Serie erstrecken sich über etwa 8 Wochen. Nach jeweils 8 bis 10 Tagen wurden die Erdkulturen mit Hilfe eines Präpariermikroskops bei 20- bis 40facher Vergrößerung beobachtet. Die sich auf den Keratinködern entwickelnden Pilze bzw. Aktinomycceten wurden mikroskopisch bei starker Vergrößerung untersucht. Die Pilze wurden auf Sabouraud-Glucose-Agar (s. Anhang Nr. 1), die Aktinomycceten auf Glycerin-Nitrat-Agar (s. Anhang Nr. 2) abgeimpft.

Von 14 Tage alten Kulturen gelang es nach einigen Passagen, Reinkulturen zu erhalten.

B. Kulturverfahren

Für die Herstellung von Keratinabbauprodukten durch Mikroorganismen wurden zwei Methoden angewandt.

1. Schüttelkulturverfahren

Für diese Untersuchungen wurde ein Pilz (K. ajelloi) und ein Streptomyces (Strept. fradiae) verwendet. Unter den Pilzen zeigte K. ajelloi bei der Keratinködermethode die größte Zuwachsrate und Keratinabbaufähigkeit. Strept. fradiae weist eine sehr hohe Aktivität beim Keratinabbau auf. Von 14 Tage alten Kulturen der beiden Stämme wurde aus Myzel und Sporen eine Aufschwemmung in 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt, mit 1,0 ml dieser Suspension wurden die Kulturkolben beimpft. 250 ml Erlenmeyer-Kolben enthalten jeweils 100 ml Nährlösung (NL) und 100 mg Keratinsubstanz in Form von fein gemahlenen entfetteten Hornspänen. Als Kontrollen dienten NL, die einerseits nur Hornspäne, andererseits nur Impfmateriel enthielten.

Die Zusammensetzung der Minerallösung nach DEMMER (1968) wurde modifiziert, d. h. ohne Stickstoff- und Kohlenstoff-Quelle, und für Pilze verwendet (s. Anhang Nr. 3).

Aktinomyceten wurden auf der Nährlösung nach NOVAL/NICKERSON (1958) kultiviert (s. Anhang Nr. 4).

Die Pilzkulturen wurden bei 25°C bebrütet und einmal täglich kurz geschüttelt. Dagegen wurden die Streptomyceskulturen bei 28°C bebrütet und ständig auf einem Schüttelgerät mit 100 - 150 U/Min. geschüttelt. Auftretende Verdunstungsverluste werden durch Zugabe von sterilem dest. H₂O ausgeglichen. Für die Auswertung werden an den Versuchstagen (VT) 7, 14, 21 usw. bis zum Ende des Versuches von jeder Variante je drei Kolben entnommen. Die NL werden steril filtriert und somit von den unlöslichen Bestandteilen (Hornspäne, Myzel und Sporen) getrennt. Die Kulturfiltrate werden sofort im Kühlschrank aufbewahrt. Dann erfolgten die verschiedenen Untersuchungen: pH-Wert, Ammoniakgehalt, Gesamtstickstoffgehalt und Aminosäure-Nachweis. Zur Anreicherung der Aminosäuren wurden jeweils 20 - 50 ml Kulturfiltrat bei 40°C bis zur Trockne eingeeengt, dann mit 1 ml 30 %igem Äthylalkohol aufgenommen. 10 - 100 µl der alkoholischen Lösung wurden aufgetragen und aufsteigend chromatographiert.

2. Fermenterverfahren

Mit diesen Methoden wurde die Abbaupzeit abgekürzt und eine ausreichende Menge von Keratinabbauprodukten erhalten.

Die beiden NL von Pilzen und Aktinomycceten wurden in größeren Mengen hergestellt (3 - 5 Liter pro Gefäß). Als Keratinmaterial dienten fein gemahlene entfettete Hornspäne (fgeH), von denen im ersten Versuch 1 - 2 g, später 5 - 10 g pro Liter NL zugegeben wurden.

Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (NL + fgeH) bei 1 atü (121°C) für ca. 30 Min. Nach ca. 60 Min. Abkühlung wurde das Impfmateriel mit Hilfe einer sterilen Spritze 0,1 ml pro 10 ml NL zugegeben. Die Bebrütungstemperatur beträgt bei Pilzen 25°C, bei Streptomyceten 28°C und bei thermophilen Aktinomycceten 55°C.

Belüftung: Luftdruck ca. 10 - 15 psi = 0,7 - 1,0 Kp/cm²
Luftmenge 2 Liter pro Min.

Rührwerk: die Rührgeschwindigkeit wurde zwischen 400 - 600 U/Min. je nach Wachstumsverlauf eingestellt.

Schaumzentrifuge: Der Rotor der Zentrifuge sollte grundsätzlich so eingestellt werden, daß er nur die oberen lockeren Schaumschichten erfaßt. Die positive Wirkung einer Schaumzentrifuge liegt nicht nur darin, daß sie den lästigen Schaum beseitigt, vielmehr begünstigt sie auch das Auswaschen der Stoffwechselgase, welche aus den Schaumblasen nach dem Abzentrifugieren nach oben entweichen. Nach Beendigung der Versuche wurden die Kulturen steril filtriert und die Kulturfiltrate anschließend sofort kühl gelagert.

C. Sterilfiltration

Mit einem Membranfilter 0,15 µ wurden die Kulturen von den unlöslichen Keratinbestandteilen, Myzel und Sporen, getrennt, um ein keimfreies Kulturfiltrat zu erhalten. Mit einem größeren Membranfilter 0,45 µ wurden nach Verrottung im Kompostierungsverfahren aus den verschiedenen Proben von Torf-Federn-Gemisch,

Federn und Torf, die wasserlöslichen Bestandteile der Keratinabbauprodukte gewonnen.

Die Extrakte wurden nochmals durch Membranfilter 0,15 μ steril filtriert und im Kühlraum bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

D. Keimzahlbestimmung

Die Keimzahl wurde nach der Methode Koch auf Agarplatten bestimmt. Diese mikrobiologische Untersuchung wurde bei dem Kompostierungsverfahren durchgeführt. Sie erfassen die Gesamtkeimzahl von Bakterien, Pilzen und Aktinomyceten im mesophilen und thermophilen Bereich. Jeweils 20 g von dem Torf-Federn-Gemisch, Federn und Torf wurden mit 180 ml 0,18 %igem Natriumpyrophosphat eine Stunde durch Rotation (50 U/Min) geschüttelt und dann Verdünnungen (10^{-1} - 10^{-9}) hergestellt. Folgende Nährböden wurden mit 1 ml Suspension/Platte beimpft:

1. Für thermophile und mesophile Bakterien (s. Anhang Nr. 5)
Mit den Verdünnungen 10^{-6} - 10^{-9} wurden jeweils drei Platten beimpft, Thermophile 2 Tage bei 55°C bebrütet, Mesophile 7 Tage bei 25°C, die entwickelten Kolonien gezählt und auf Mill. Keime/g Trockensubstanz umgerechnet.
2. Für thermophile und mesophile Pilze: Malz-Agar (s. Anhang Nr.6).
Verdünnung: 10^{-3} - 10^{-5}
Temperatur: 25°C bzw. 47°C, 7 Tage
3. Für mesophile Aktinomyceten: Glyzerin-KNO₃-Agar (s. Anhang Nr. 2)
Verdünnung: 10^{-3} - 10^{-5}
Temperatur: 25°C, 7 bzw. 14 Tage
4. Für thermophile Aktinomyceten: Lab Lemco Yeast Extract-Agar (s. Anhang Nr. 7)
Verdünnung: 10^{-3} - 10^{-5}
Temperatur: 55°C, 7 Tage

E. Bioautographischer Versuch

Für die Dünnschicht-Chromatographie wurden Zellulose-Fertigplatten (ohne Fluoreszenzindikator) mit einer Schichtdicke von 0,10 mm verwendet. Die Methode nach VLADIMIR (1973) wurde modifiziert. Für die bioautographische Entwicklung der Dünnschichtplatten wurde das ungefärbte, lufttrockene Chromatogramm vorsichtig direkt auf den beimpften Nährboden gelegt. Zur Verwendung kamen große Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm.

Um die entsprechenden Substanzen diffundieren zu lassen, wurden die Platten etwa eine Stunde in Kontakt mit dem Nährboden gelassen. Mit Hilfe eines Spatels wurde dann die Dünnschichtplatte abgehoben und die Petrischalen bei 25°C 24 Stunden bebrütet. Als Testmikroorganismen dienen Bacillus subtilis, B. mycoides, B. stearothermophilus und E. coli. Als Nährboden diente Standard II Nutrient-Agar (Merck) (s. Anhang Nr.8). Das Impfmateriel betrug 0,5 ml pro 50 ml Nährboden.

Abb. 1: Darstellung einer Petrischale während der Bioautographie im Querschnitt



Als Kontrolle diente das reine Lösungsmittel ohne aufgetragene Substanzen. Für die Auswertung wurde nach Bebrütung das Bakterienwachstum auf den Platten mit dem der Kontrolle verglichen und fotografiert.

F. Selbsterhitzungsversuche und Kompostierung

Für die Untersuchung einer Selbsterhitzung bei der Kompostierung von Keratinsubstanzen wurde mit Weckgläsern in der Temperaturdifferenzregelanlage nach NIESE (1965, 1967) gearbeitet.

Als Ausgangsmaterial diente ein Gemisch von Federmehl mit Weiß-

torf. Das Torf-Feder-Gemisch, Federn und Torf wurden mit dest. H_2O angefeuchtet, dann locker in Dewargefäße bzw. Weckgläser gefüllt. Die zuzusetzende Wassermenge hängt von den Proben und der Rottezeit ab.

Der Hauptversuch lief 60 Tage. Die Dewargefäße wurden mit Styropor von 4 cm Dicke abgedeckt, während die Weckgläser mit einem Deckglas zugedeckt und im Brutschrank bei $60^{\circ}C$ bebrütet wurden. Um die Wirkung von zusätzlicher Glucose und $CaCO_3$ zu prüfen, wurden in einem Vorversuch verschiedene Mengen dieser Stoffe zugegeben. In einem zweiten Vorversuch wurden die Dewargefäße mit Torf-Federn-Gemisch locker gefüllt und nach jeweils 10 Tagen ein Gefäß für folgende Untersuchungen herausgenommen:

1. Wassergehalt
2. pH-Wert
3. Leitfähigkeit
4. Registrierung des Temperaturverlaufs bei der Selbsterhitzung
5. Ammoniakbestimmung
6. Gesamtstickstoffbestimmung
7. Qualitativer Nachweis von Aminosäuren
8. Nachweis von anderen vermutlichen Zwischenprodukten

G. Die Herstellung von Extrakten

Diese Methode diente zur Herstellung von Extrakten aus Torf-Federn-Gemisch, Federn und Torf vor und nach der Kompostierung. Der Wassergehalt wurde bei allen Proben auf 82,5 % eingestellt. Ein angefeuchtetes Membranfilter (100 mm, $0,45 \mu$) wurde auf die Filterunterstützung gelegt, darauf kam ein trockenes Glasvorfilter (9,0 mm), und der Zylinder wurde festgeschraubt.

Nach Einfüllen der verschiedenen Substanzen wurde der Preßzylinder bei geöffnetem Entlüftungsventil langsam unter Druck gesetzt, bis der erste Extrakt abgepreßt wurde. Erst bei deutlich sichtbarem Nachlassen der Extraktmenge wurde der Druck vorsichtig auf etwa 3 atü erhöht. Dieser Druck wurde etwa 5 Min. belassen (weitere Druckstufen 5 Min./ 5 atü; 5 Min./ 7 atü; 5 Min./

9-10 atü). Alle Druckstufen wurden durch langsamen Druckanstieg erreicht. Nach ca. 20 Min. Preßdauer soll nicht mehr als 1 Tropfen/3 Sek. abgepreßt werden. Das Filtrat wurde nochmals durch 0,15 µ Membranfilter filtriert und in Erlenmeyer-Kolben verschlossen im Kühlraum für die weiteren Untersuchungen aufbewahrt.

H. Keimversuch

Die Methode nach FLAIG & OTTO (1951) wurde mit wenigen Veränderungen durchgeführt. Mit Gartenkresse (Lepidium sativum) als Testobjekt wurden die verschiedenen Extrakte von Torf-Federn-Gemisch, Federn und Torf geprüft. Es kommt in diesem Versuch darauf an, deutliche Unterschiede im Wachstum bei verschiedenen Konzentrationen zu erzielen. 50 Samen wurden in fünf Reihen auf Filterpapier (9 cm Durchmesser) in Petrischalen gelegt und im dunklen Raum bei Zimmertemperatur zum Auskeimen belassen. Die Varianten wurden in vier Konzentrationen (10 ml pro Petrischale) zugegeben. Jeden Tag wurden 10 Samen einer Reihe entnommen und die Keimung in Prozent sowie die Wurzellänge berechnet bzw. gemessen. Die Versuchsdauer betrug vier Tage. Die Zuwachsrate wurde errechnet und statistisch ausgewertet.

H. Gefäßversuch

Als geeignete schnellwüchsige Testpflanze erwies sich die Sonnenblumensorte "Hesa" (Helianthus annuus). Blumentöpfe mit 9 cm Durchmesser wurden für diesen Versuch verwendet. Eine abgewogene Menge von Quarzsand (0,7 - 1,2 mm Korngröße) wurde mit folgenden Düngemengen gut gemischt:

8,0 g	CaCO ₃
1,0 g	MgCO ₃
4,0 g	CaHPO ₄ · H ₂ O
4,0 g	K ₂ SO ₄
30 mg	H ₃ BO ₃

Je Gefäß, das mit Filterpapier ausgelegt war, wurden 4 Samenkörner in 2 cm Entfernung vom Rand und 2 cm tief eingelegt. Als Mikronährstoffe wurden 20 ml Nährlösung nach MENGEL (1965) zugegeben.

	(mg pro Liter)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,386
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,349
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,402
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,057
Fe-Chelat	11,7

In einem Vorversuch wurden die Kulturfiltrate von K. ajelloi und Strept. fradiae geprüft. Für die anderen Versuche wurde nur das Kulturfiltrat von K. ajelloi auf Nährstoff- und Wachstumswirkung in mehreren Wiederholungen untersucht. Die Durchführung des Gefäßversuches erfolgte unter Anleitung von Prof. Dr. Kühn (Institut für Pflanzenernährung Giessen).

IV. ERGEBNISSE

A. Darstellung von Abbauprodukten

1. Chemische Hydrolyse

Keratin besteht zum größten Teil aus Stickstoff-haltigen Verbindungen, die sich nicht nur im Bindegewebe finden, sondern auch den Hauptbestandteil von Haaren, Federn und hornartigen Hautgebilden darstellen. Die Keratine lösen sich in keinem anorganischen oder organischen Lösungsmittel, wenn nicht vorher Wasserstoffbrücken, Salzbindungen oder Cystinbrücken abgebaut oder gespalten werden. Nach ZAHN (1951): Zur Stabilisierung von Keratin tragen am meisten die S-S-Brücken bei. Erst wenn diese gelöst werden, geht das Keratin ganz oder teilweise leicht in Lösung. Zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren muß eine vollständige Hydrolyse von Keratin durchgeführt werden. Nach gründlicher Auswaschung des Ausgangsmaterials und Entfernung des Fettes mit Chloroform (2-3 Std.) wurde das Material unter P_2O_5 bis zur Hydrolyse aufbewahrt. 10 mg Federn bzw. Wolle wurden entsprechend der vorher erwähnten Methode hydrolysiert und die einzelnen Aminosäuren im Aminosäureanalysator bestimmt (Tab. 2). Das Keratin der Federn oder Wolle enthält 17 verschiedene Aminosäuren, während aus der in der Literatur angegebenen Tab. 1 (S. 8) 18 verschiedene Aminosäuren zu erkennen sind. Nach eigenen Untersuchungen war Tryptophan im Hydrolysat nicht nachweisbar, es wurde wahrscheinlich während der Hydrolyse mit 25 %iger HCl zerstört.

2. Biologischer Abbau durch Mikroorganismen

Zunächst wurden die wichtigsten keratinabbauenden Mikroorganismen aus Gartenerde mit Hilfe der Keratinködermethode nach VANBREUSEGHEM (1952) isoliert. Die Annahme, daß in der Erde keratinverwertende Mikroorganismen leben können, hat sich durch diese Versuche bestätigt. Am Versuchsbeginn wurden einige Arten von Penicillium, Aspergillus, Mucor und Fusarium gefunden. Obwohl sie auf Keratinködern gut wachsen, zeigte sich später eine

Tab. 2: Aminosäuren in je 10 mg Keratinmaterial nach chemischer Hydrolyse in 25 % HCl - 105°C - 24 Std.

Aminosäure	Federmehl		Schafwolle	
	mg	%	mg	%
Lysin	0,170	2,153	0,247	3,3
Histidin	0,041	0,519	0,052	0,70
Arginin	0,534	6,76	0,780	10,40
Asparaginsäure	0,752	6,76	0,545	7,27
Threonin	0,458	5,80	0,507	6,76
Serin	0,887	11,23	0,705	9,41
Glutaminsäure	0,623	7,89	1,145	15,27
Prolin	0,576	7,29	0,506	6,75
Glykokoll	0,062	0,78	0,480	6,5
Alanin	0,392	4,96	0,330	4,44
Cystin	0,894	11,32	0,915	11,32
Valin	0,468	5,92	0,350	4,72
Methionin	0,064	0,81	0,053	0,71
Isoleucin	0,472	5,97	0,052	0,70
Leucin	0,813	10,30	0,800	11,30
Tyrosin	0,290	3,77	0,435	5,80
Phenylalanin	0,389	4,93	0,380	3,75
Gesamt	7,895		8,282	

sehr schwache Aktivität beim Keratinabbau in Reinkulturen. Nach Färbung der Federn- bzw. Hornspäne-Myzel-Partikel in Laktophenol-Baumwollblau waren mikroskopisch Veränderungen der Federn-Horn-Keratin-Strukturen unter dem Einfluß des Pilzmyzels zu beobachten. Nach ca. 5 - 6 Wochen wurden die langsamer wachsenden keratinolytischen erdbewohnenden Dermatophyten wie M. gypseum, K. ajelloi und T. terrestre isoliert. Diese keratinolytisch aktiven Pilze wurden für die weiteren Versuche eingesetzt. Die Zerstörungen der Federkeratine wurden im Fluoreszenzmikroskop beobachtet und ließen sich durch einen unmittelbaren Kontakt mit den Pilzhypphen von K. ajelloi und damit lokal engbegrenzter und konzentrierter Enzymeinwirkung erklären.

Die folgenden keratinophilen Mikroorganismen sind häufig auf Keratinköder zu finden:

1. K. ajelloi (VANBREUSEGHEM 1952)

- a) Koloniewachstum: Die Kolonie wächst relativ schnell, der Koloniedurchmesser beträgt nach 7 Tagen bei 25°C 12 - 15 mm, nach 14 Tagen zwischen 35 - 40 mm (Abb. 2). Das anfänglich weiße Myzel verfärbt sich im Zentrum meist schon nach 4 Tagen rosa-bräunlich. Die Rückseite der Kultur ist meistens farblos, in einigen Fällen auch violett-schwarz gefärbt.
- b) Konidien: Die Hyphen waren bei 14 Tage alten Kulturen deutlich verzweigt und septiert. Die typische Makrokonidie besitzt eine länglich-schmale und am Ende mehr oder weniger abgerundete Form. Die Makrokonidien treten meist in großer Zahl und in Gruppen zusammenliegend auf. Sie weist durchschnittlich 10 Kammern auf (Abb. 3). Die Konidienwand ist dicker als bei M. gypseum.

2. Tr. terrestre (BURIE und FREY 1957)

- a) Koloniewachstum: Tr. terrestre wächst anfangs langsamer als K. ajelloi, nach 14 Tagen betrug der Koloniedurchmesser aber auch ca. 40 mm. Anfangs ist die Kolonie weiß und verändert allmählich die Farbe nach gelblich, auch die Rückseite der Kolonie zeigt eine gelbe Farbe.



Abb. 2: Keratinomyces ajelloi auf Sabrood-Glucose-Agar nach 14 Tagen bei 25°C.

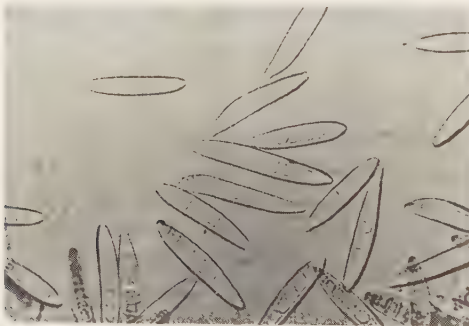


Abb. 3: Makrokonidien von K. ajelloi bei 45facher Vergrößerung



Abb. 4: Streptomyces fradiae auf Glyzerin-NO₃-Agar, nach 14 Tagen, bei 25°C.

- b) Morphologie: An den Lufthyphen bilden sich Mikro- und Makrokonidien. Es sind 2 - 6 Kammern bei jeder Makrokonidie zu beobachten.

3. M._gypseum (FUENTES, ABOULAFIA & VIDAL 1954)

- a) Koloniewachstum: Nach 3 - 4 Tagen Wachstum hat die weiße Kolonie einen Durchmesser von 10 - 12 mm, nach 14 Tagen eine Größe von 40 - 45 mm Durchmesser. Der Pilzrasen nimmt eine trockene, körnige, charakteristisch gelbbraunliche bis zimtfarbige Beschaffenheit an. Auch die Rückseite der Kultur färbt sich rotbraun.
- b) Morphologie: Die Hyphen sind septiert mit Seitenästen. Charakteristisch sind die Makrokonidien, die der Kultur ihr pulveriges Aussehen verleihen. 4 - 7 Kammern sind in jeder Konidie zu erkennen.

4. Strept._fradiae (WAKSMAN & CURTIS 1919)

Auf Kartoffel-Agar, Hafer-Agar und G-N-Agar wurden verschiedene Arten von Streptomycceten aus Gartenerde mit Keratinköder isoliert. Am häufigsten war Strept._fradiae zu finden. Auf Glyzerin-Nitrat-Agar wächst die Kolonie mit glatter Oberfläche (Abb. 4), das Luftmyzel ist orange bis rot. Die Sporenträger sind monopodial verzweigt und spiralg.

5. Th._vulgaris (TSIKLINSKY 1899)

Bei den Kompostierungsversuchen war dieser Aktinomycet in dem Torf-Federgemisch am häufigsten zu finden. Diese thermophile Actinomycetenart wurde später auf ihre Aktivität beim Keratinabbau geprüft.

Thermoactinomyces ist thermophil, bildet Luft- und Substrat-Myzel, Einzelsporen treten bei beiden Myzeltypen auf. Nach KÜSTER und LOCCI (1964) ist Th._vulgaris die einzige Art dieser Gattung, Micromonospora vulgaris ist ein Synonym.

Nach Wachstum auf LLY-Agar bei 55°C sieht das Luftmyzel staubig-weiß aus, die Substrathyphen sind nur geringfügig verzweigt und

verlaufen geradlinig. Die Einzelsporen sitzen meist direkt an der Hyphe, kurze Sporenträger werden nur selten gebildet.

a) Durch Reinkultur

Beim mikrobiellen Keratinabbau. Um eine ausreichende Menge von gelösten Keratinabbauprodukten zu erhalten, wird man mit verschiedenen Problemen konfrontiert.

1. Auswahl von geeigneten Keratin-haltigen Substanzen als Ausgangsmaterial.
2. Herstellung von Nährmedien mit Keratin als C- und/oder N-Quelle, die noch Wachstum und Abbauaktivität der Mikroorganismen ermöglichen.
3. Berücksichtigung verschiedener Kulturbedingungen für eine maximale Ausbeute an Abbauprodukten.

In zahlreichen Vorversuchen wurden verschiedene keratinhaltige Substanzen, wie Wolle, Haare, Federn und Hornspäne im Schüttelkulturverfahren geprüft. Nach diesen Untersuchungen schienen fein gemahlene entfettete Hornspäne als Ausgangsmaterial besonders gut geeignet zu sein. Auch nach früherer Erfahrung von ZIEGLER (1966) zeigen sich beim Keratinabbau folgende Relationen (Tab. 3).

Tab. 3: Relation Keratinabbau

Mikroorganismen	Horn- Keratin	Haar-
a. In Beziehung zum Ausgangsmaterial		
<u>Tr. mentagrophytes</u>	100	54
<u>P. lilacinum</u>	100	35
b. In Beziehung zum Abbauorganismus		
<u>Tr. mentagrophytes</u>	100	100
<u>P. lilacinum</u>	96	63
<u>P. ianthineleum</u>	36	

Diese Ergebnisse bestätigen die Meinung von ZIEGLER (1966), daß Hornspäne am leichtesten von allen keratinhaltigen Substanzen durch aktive keratinophile Mikroorganismen abgebaut werden können.

Unter Berücksichtigung der Angaben zahlreicher Autoren (GEORG (1951), SILVA & BENHAM (1952), HUMFELD & SUGIHARA (1952)) und aufgrund der Erfahrungen aus eigenen Vorversuchen wurde eine Nährlösung (NL) nach DEMMER (1968) für Pilze modifiziert und zusammengestellt (s. Anhang Nr. 3). Ohne den Kohlehydrat- und Stickstoffanteil wurde diese Nährlösung als Basis-NL bezeichnet. Für Aktinomyceten wurde die NL nach NOVAL & NICKERSON (1959) verwendet. Die beiden Nährlösungen sind in quantitativer Hinsicht (s. Anhang Nr. 4) relativ nährstoffarm, qualitativ jedoch vollwertig. Die Pufferkapazität dieser NL ist gering, so daß durch den Stoffwechsel der Pilze bzw. Streptomyceten verursachte pH-Veränderungen leicht erkannt und verfolgt werden können. Die Keratin-NL enthielt praktisch keine gelösten, für den Myzelaufbau geeigneten organischen Bestandteile. Deshalb konnten die für den Aufbau- und Erhaltungsstoffwechsel notwendigen C- und N-Verbindungen nur durch Enzyme, die von den Pilzen bzw. Aktinomyceten ausgeschieden wurden, aus dem Keratin freigesetzt werden. Die NL dieser Versuchsreihe enthielt neben Hornkeratin als hauptsächliche N- und C-Quelle noch Spuren von Tryptophan, Histidin und Methionin. Diese Aminosäuren sollten nur das Anwachsen des Impfmateri als ermöglichen. Die Wasserstoffionenkonzentration spielt beim mikrobiellen Keratinabbau eine wichtige Rolle. Von mehreren Autoren NICKERSON & WILLIAMS (1947), STOCKDALE (1953), GÖTZ (1957) und ZIEGLER & BÖHME (1963) konnte bereits bewiesen werden, daß alle wesentlichen Wachstums- und Entwicklungsoptima der Dermatophyten zwischen pH 6 und 8 liegen. Junges wachsendes Myzel verändert aktiv das pH des umgebenden Nährsubstrates, sofern es sich um ein relativ saures Substrat mit geringer Pufferkapazität handelt. NOVAL & NICKERSON (1959) haben nachgewiesen, daß neutrale bis schwach alkalische pH-Werte der NL von etwa 7,7 bei Strept. fradiae die Zeit des Keratinabbaues abkürzen können. Es ist weiterhin zu berücksichtigen, daß die pH-Werte der NL und ihre Veränderungen in erster Linie durch Ammoniak-

freisetzung z. B. nach enzymatischer Hydrolyse der Säureamidgruppen sowie Desaminierung, zustande kommen, besonders in einem Kohlenhydrat-armen oder -freien Medium mit ungünstigem C/N Verhältnis ($C/N = 6:1$). Je besser ein Pilz Keratin verwerten kann, um so höher steigt der pH-Wert an. Desgleichen wird durch erhöhte Temperatur die Keratin-Abbaurrate beschleunigt. Strept. fradiae baut bei 35°C 50 % des Wollkeratins in 5 Tagen ab, während bei 28°C der gleiche Abbaugrad erst in 6 Tagen erreicht wird (NOVAL & NICKERSON 1959).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß sowohl K. ajelloi als auch Strept. fradiae zur enzymatischen Spaltung des Keratins in AS befähigt sind. Im Fermenter baut Strept. fradiae innerhalb von 10 Tagen ca. 80 % des Hornkeratins ab, während der Abbau durch K. ajelloi in 14 Tagen nur 70-75 % beträgt. Unabhängig von der Keratinsorte erzielte dabei Strept. fradiae höhere alkalisierend wirkende NH_4 -Titer bei größerer Wachstumsgeschwindigkeit als K. ajelloi. Diese alkalisierende Tendenz erleichtert den Keratinabbau. Ebenfalls im Fermenter wurden 74 % aus Hornkeratin innerhalb von 11 Tagen durch Th. vulgaris bei 55°C abgebaut, während M. gypseum nur 54 % des Hornkeratins bei 25°C innerhalb von 14 Tagen abbaut. Das heißt, daß die keratinophilen Mikroorganismen eine unterschiedliche Angriffsfähigkeit auf das Keratinmaterial besitzen.

Der Abbaugrad des Keratins im Schüttelkultur- und Fermenterverfahren

Die Versuche über die Angriffsfähigkeit von Mikroorganismen auf Keratinmaterial im Schüttelkulturverfahren in 250 ml Erlenmeyerkolben bei verschiedenen Temperaturen werden als Vorversuche betrachtet. Als keratinabbauende Mikroorganismen wurden K. ajelloi und Strept. fradiae verwendet. Die Dauer der Versuche betrug 6 Wochen. In den geschüttelten Kulturen entwickelte K. ajelloi zunächst einzelne Myzelkugeln, die sich nach ca. 4 Wochen zu einer festen Decke zusammenschlossen. Die Myzeldecke war auch durch wiederholtes Schütteln nicht mehr aufzureißen und umschloß fast

alle Hornteilchen der NL. Durch den eingetretenen O_2 -Mangel wird ein weiteres Submers-Wachstum verhindert. Eine exakte Ergänzung der Verdunstungsverluste durch dest. Wasser war ungenau und praktisch undurchführbar. Wachstumsgeschwindigkeit, Myzelaufbau sowie der Keratinabbau verlaufen in der Schüttelkultur langsamer als im Fermenter. Die meisten Probleme, die sich aus dem Schüttelkulturverfahren ergeben, wurden mit Hilfe des Fermenters gelöst. Die Kulturfiltrate wurden steril durch Membranfilter ($0,15 \mu$) von den ungelösten Keratinresten getrennt. Das Kulturfiltrat wurde sofort auf $4^\circ C$ abgekühlt. Anschließend wurden folgende weitere analytischen Untersuchungen durchgeführt:

1. pH-Messung
2. Ammoniakbestimmung
3. Gesamtstickstoffbestimmung
4. Aminosäurebestimmung
5. Nachweis von anderen vermutlichen Zwischenprodukten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in den Abb. 5, 6 und 7 und in den Tabellen 4 - 6 zusammengestellt.

Die Veränderungen der pH-Werte während der Keratinabbauvorgänge beruhen in erster Linie auf dem in ernährungsphysiologischer Hinsicht ungünstigen C/N-Verhältnis des Keratins. Je besser ein Pilz bzw. Streptomyces Keratin verwertet, um so höher steigt der pH-Wert an. Die Reaktionen und Abbauvorgänge führen durch Ammoniakfreisetzung zu einer Alkalisierung der NL, dadurch nimmt der Abbaugrad des Keratins relativ schnell zu. Der Ammoniakgehalt im Kulturfiltrat kann indirekt als Beweis der Keratinolyse angesehen werden. Im Vergleich zu Strept. fradiae setzt K. ajelloi eine größere Menge an Ammoniak aus Hornspänen frei. Wird allerdings der freigesetzte Gesamt-N als Maßstab für den Keratinabbau eingesetzt, ergeben sich etwas andere Verhältnisse. Dann ist bei Strept. fradiae die Abbaurate je nach Kulturverfahren sogar erheblich höher. Da in den Kulturfiltraten Myzel und Sporen nur schwer von den Hornteilchen zu trennen sind,

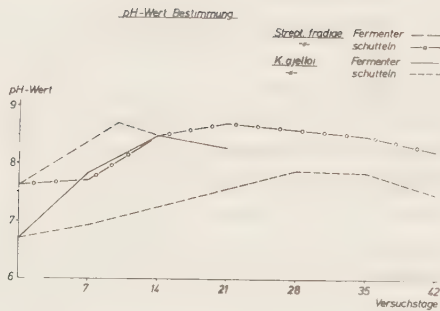


Abb. 5 : pH-Wert-Bestimmung

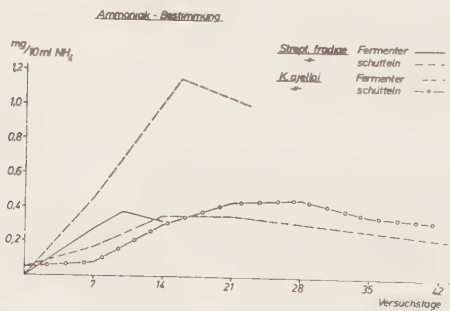


Abb. 6 : Ammoniak-Bestimmung

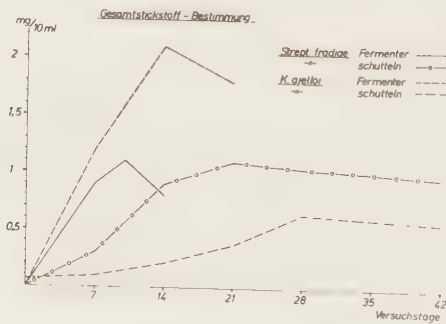


Abb. 7 : Gesamt-N-Bestimmung

Tab. 4: Der mikrobielle Abbau von Hornspänen 100 mg/100 ml im Schüttelkulturverfahren

Kulturfiltrat	Strept. fradiae n. 21 Tagen	K. ajelloi n. 28 Tagen
pH	8,7	7,9
Ammoniakgehalt mg/10 ml	0,36	0,45
Gesamt-N mg/10 ml	1,11	0,65
Abbau in %	78,5	46,4

Tab. 5: Der mikrobielle Abbau von Hornspänen im Fermenter

Kulturfiltrat	Th. vulgaris n.11 Tagen	Strept.fradiae n.10 Tagen	K.ajelloi n.14 Tagen	M.gypseum n.14 Tagen
Ausgangsmaterial mg/100 ml	500	100	200	500
pH	8,1	8,7	8,5	8,7
Ammoniak mg/10ml	1,05	0,38	1,16	2,82
Gesamt-N mg/10ml	5,20	1,12	2,10	3,78
Abbau in %	74,28	80,0	75,0	54,0

wurde darauf verzichtet den Keratinabbau mit Hilfe der Trockensubstanzverluste des Keratins zu ermitteln. Unter der Annahme, daß der lösliche Anteil des Stickstoffs im Kulturfiltrat nur aus der Keratinsubstanz stammt, wurde der Stickstoffgehalt der Kulturfiltrate als Maßstab für einen Keratinabbau in Prozent umgerechnet. Aufgrund der Versuchsergebnisse, die in den Kurven und Tabellen dargestellt sind, lassen sich über den mikrobiellen Keratinabbau durch K. ajelloi und Strept. fradiae in Abhängigkeit von den beiden angewandten Kulturverfahren folgende Schlüsse ziehen.

A. K. ajelloi

1. pH-Wert:

In der Schüttelkultur stieg die Wasserstoffionenkonzentration im Kulturfiltrat innerhalb von 28 Tagen von 6,7 auf 7,9 und sank danach wieder bis zu 7,3 ab. Im Kulturfiltrat der Fermenterkultur stieg dagegen innerhalb von nur 14 Tagen der pH-Wert von 6,5 sogar bis 8,5 bei der gleichen Bebrütungstemperatur an. Vermutlich begünstigt dieser erhebliche pH-Anstieg in den alkalischen Bereich den Keratinabbau und beschleunigt damit die Abbauvorgänge.

2. NH_4 -Gehalt:

Beim Vergleich der Werte für das freigesetzte Ammoniak und dem Gesamt-N-Gehalt in den beiden Kulturverfahren läßt sich erkennen, daß die Abbaurate im Fermenter im gleichen Zeitraum erheblich höher ist.

Tab. 6

K. ajelloi	Schüttelkultur 28 Tage	Fermenter 14 Tage
mg NH_4 /10 ml Kulturfiltrat bezogen auf gleiche Ausgangs- menge	0,45	0,58
Keratinabbau bezogen auf lösli. Ges.-N	46,4 %	75 %

B. Strept. fradiae

1. pH-Wert:

In der Schüttelkultur stieg innerhalb von 21 Tagen der pH-Wert von 7,6 auf 8,7 erst langsam, dann relativ schnell an, während im Fermenter der pH auf den gleichen Wert von 8,7 innerhalb von nur 10 Tagen anstieg. Im Fermenter wurde die gleiche alkalische Reaktion in der halben Zeit erreicht, verglichen mit der Schüttelkultur.

2. Ammoniakgehalt:

Das freigesetzte Ammoniak in beiden Kulturfiltraten zeigte nur sehr geringe Unterschiede im Vergleich zu den keratinophilen Pilzen, die mehr Ammoniak aus der gleichen Menge des Ausgangsmaterials freisetzen können.

3. Gesamtstickstoffgehalt:

Auch im Stickstoffgehalt in den beiden Kulturfiltraten war kein großer Unterschied zu erkennen. Im Schüttelkulturverfahren wurden 78,5 % des Hornkeratins innerhalb von 21 Tagen abgebaut, während im Fermenter bis zu 80 % des Keratins innerhalb von nur 10 Tagen abgebaut wurden. Die Tendenz war auch hier die gleiche, im Fermenter benötigt der Organismus nur die halbe Zeit für die gleiche Abbaurate.

4. Nachweis von Aminosäuren:

Für die Identifizierung der durch das wachsende Myzel von Hornkeratin abgespaltenen Aminosäuren wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet.

Auf dem Chromatogramm ließen sich mit Hilfe von Vergleichssubstanzen folgende Aminosäuren nachweisen (s. Tab. 7).

Tab. 7: Aminosäure im Kulturfiltrat von Keratin-abbauenden Mikroorganismen

Aminosäure	K. ajelloi		Strept. fradiae		Th. vulgaris
	mg AS	%AS	mg AS	%AS	
Asparaginsäure	0,47	8,4	0,308	9,65	x
Valin	0,352	6,3	0,188	5,90	x
Cystin	0,683	12,2	0,460	14,40	x
Arginin	0,576	10,3	0,409	12,80	
Alanin	0,476	8,5	0,304	6,40	
Threonin	0,403	7,2	0,278	8,70	x
Histidin	0,100	1,8	-	-	x
Phenylalanin	0,425	7,6	0,076	2,40	x
Methionin	0,095	1,7	0,042	1,32	x
Serin	0,520	9,3	-	-	x
Leucin	0,560	10,0	0,320	10,0	x
Glutaminsäure	0,459	8,20	-	-	x
Lysin	0,296	5,30	0,167	5,23	
Glykokoll	0,156	2,80	-	-	
Tyrosin			0,246	7,70	x
Gesamt	5,600		3,200		

x = Qualitativer Nachweis

Die keratinophilen Mikroorganismen setzen also verschiedene Aminosäuren in unterschiedlichen Mengen frei.

b) Darstellung von Keratinabbauprodukten bei Kompostierung

Aufgrund der Tatsache, daß grobes Material wie z.B. lange Federn kaum für die Kompostierung geeignet sind, wurde fein gemahlendes keratinhaltiges Material in Form von Federmehl für diesen Zweck ausgewählt. Da Federmehl zur Verdichtung neigt, wurde das Material zur Auflockerung mit Weißtorf in bestimmten Verhältnissen gemischt, um es kompostierbar zu machen.

Das Gemisch wurde mit sterilem dest. Wasser angefeuchtet und in Dewargefäße gefüllt, die in der Temperaturdifferenzregelanlage einer Selbsterhitzung unterworfen wurden. Nach einiger Zeit war das Material stark angerottet. Hierbei ist es wichtig, daß die biologischen Umsetzungen durch Mikroorganismen, besonders durch thermophile Aktinomyceten und Bakterien erfolgen. Durch Verrottungsvorgänge wird das Federkatin in ausreichender Menge abgebaut und zu Nährstoffen und Wirkstoffen in löslicher Form umgesetzt. Diese werden steril extrahiert und in einem Keimpflanzentest bzw. mit Testmikroorganismen auf ihre physiologische Wirksamkeit geprüft. Der Abbau des Federmehls war zuverlässig zu verfolgen, wenn sich die Rotte über einen längeren Zeitraum erstreckte. Für die Untersuchung von Kompostporben, die nach einer bestimmten Rottezeit von 10, 20, 30 Tagen entnommen wurden, war die Methode der Selbsterhitzungsfähigkeit in Laborverhältnissen für diese Zwecke ausreichend.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Bearbeitung folgender zwei Fragen:

1. Welche Mischungsverhältnisse von Federmehl und Torf sind am günstigsten, um die höchste Temperatur durch Selbsterhitzung zu erreichen?
2. Welche Zugabe von Glucose und CaCO_3 ist notwendig, um die Abbaufähigkeit des Keratins zu beeinflussen?

Um die Kompostierungsverfahren und die Rottevorgänge beurteilen zu können, wurden in den vorliegenden Versuchen die Keimzahl,

pH-Wert, Ammoniakgehalt und Leitfähigkeit sowie Aminosäuren und andere vermutliche Zwischenprodukte nachgewiesen, die aus dem Keratinstoffwechsel der Mikroorganismen stammen. Die Wirkung einer Glucose- und CaCO_3 -Zugabe auf einen Keratinabbau wurde in der Temperaturdifferenzregelanlage in Substraten mit verschieden hohem Federmehl-Anteil untersucht. 250 g lufttrockener Torf wurden mit 5, 15 bzw. 25 % Federmehl gemischt und mit 250 ml einer 0,56 %igen Glucoselösung versetzt, so daß sich ein Wassergehalt von etwa 70 % ergab. Da der Federanteil verschieden hoch ist, ist auch die Einwaage pro Gefäß unterschiedlich. Das Ergebnis ist aus Abb. 8 und den Tabellen 8 und 9 zu ersehen.

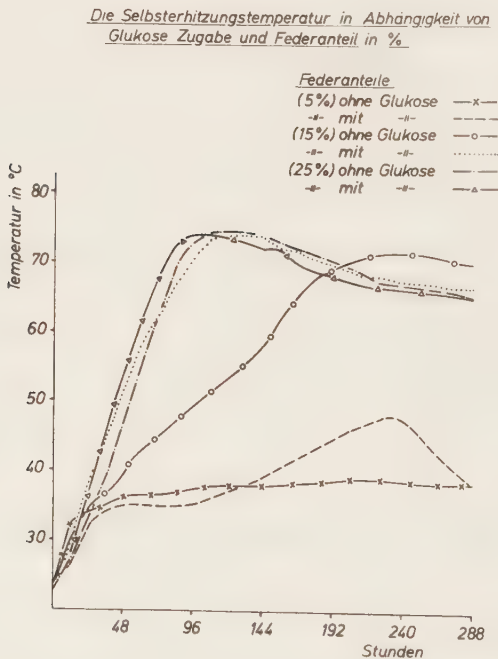


Abb. 8 : Selbsterhitzung

Tab. 8: Wirkung einer Glucose-Zugabe auf die Temperaturerhöhung verschiedener Torf-Federngemische

Federanteil in Gemisch		Einwaage in g/Gefäß	Wasser- gehalt in %	Höchsttem- peratur °C	erreicht nach Stunden
5 %	ohne Glucose	410	73,02	39	156
	mit Glucose	380	73,07	48	228
15 %	ohne Glucose	390	70,97	72	252
	mit Glucose	390	69,36	73	132
25 %	ohne Glucose	395	70,02	74	108
	mit Glucose	385	69,55	74	108

Versuchsdauer: 290 Stunden

Tab. 9: Wirkung einer CaCO_3 -Zugabe auf eine Temperaturerhöhung von verschiedenen Torf-Federngemischen

Torf/Federn- Gemisch		pH-Wert	Wasser- gehalt in %	Höchsttem- peratur °C	erreicht nach Stunden
4:1	ohne CaCO_3	4,2	58,82	55	156
	mit CaCO_3	6,3	59,46	70,0	144
2:1	ohne CaCO_3	5,0	56,7	66,5	120
	mit CaCO_3	6,6	64,0	72,5	84
1:1	ohne CaCO_3	5,3	64,0	68,0	120
	mit CaCO_3	6,5	57,39	70,0	96

Versuchsdauer: 156 Stunden

Einwaage: 300 g (Gemisch vor der Zugabe von 200 ml H_2O)
pro Gefäß 4,5 g CaCO_3

Eine Glucose-Zugabe macht sich auf die Temperaturerhöhung nur bei einem Federkeratinanteil von 5 % bemerkbar. Bei den höheren Keratinanteilen ist ein Glucose-Zusatz ohne Bedeutung. Anscheinend ist der niedrige Keratinanteil von 5 % zu gering, um selbst bei einem Glucosezusatz einen meßbaren Keratinabbau zu erzielen. In dem Gemisch mit 25 % Keratin kommt es schon nach relativ kurzer Zeit zu einem Temperaturanstieg bis zu 74°C, was gleichbedeutend ist mit einem hohen Keratinabbau.

Aus diesem Vorversuch läßt sich erkennen, daß bei den niedrigen Mischungsverhältnissen, d. h. bei einem geringen Federanteil, eine Temperaturerhöhung nach CaCO_3 -Zusatz deutlich wird. Nimmt der Federanteil zu, verliert die CaCO_3 -Gabe ihre Bedeutung.

Im folgenden Versuch sollten die mikrobiologischen Vorgänge während der Kompostierung verfolgt und eventuell eintretende physikalische und chemische Veränderungen gemessen werden.

Federmehl wurde mit Torf 1:1 gemischt und ohne einen Zusatz von Glucose und CaCO_3 in Dewargefäßen in der Temperaturdifferenzregelanlage einem natürlichen Rotte- und Kompostierungsprozeß ausgesetzt. Im Abstand von je 10 Tagen wurden in einem Gefäß die folgenden Bestimmungen vorgenommen: Temperatur, pH-Wert, Wassergehalt, Ammoniak, Gesamtstickstoff, Leitfähigkeit und Keimzahl verschiedener Mikroorganismen-Gruppen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

1. Keimzahl verschiedener Mikroorganismen-Gruppen in Abhängigkeit von der Rottetemperatur:

Der wechselnde Temperaturverlauf in der Rotte bringt ständige Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikroflora mit sich. Bei niedrigen Temperaturen in der Anfangs- und Endphase der Rotte herrschen Mesophile vor und bei höheren Temperaturen über 60°C steigt der Anteil an thermophilen Keimen erheblich an. Die Keimzählungen zeigen erneut, daß während der Rotte und bei einem Temperaturanstieg erhebliche Veränderungen in dem Verhältnis mesophile/thermophile Bakterien auftraten.

2. Die Abbauprodukte in Abhängigkeit von Leitfähigkeit:

Die Leitfähigkeit im Wasserextrakt des Torf-Feder-Gemisches, die innerhalb von 50 Tagen um das 2,5fache angestiegen war, gibt an, daß sich während der Abbau- und Verrottungsvorgänge lösliche Stoffe in höheren Konzentrationen anreicherten.

3. Der Ammoniakgehalt in Abhängigkeit von Abbauprozessen:

Durch die biologische Umsetzung von Federmehl während der Kompostierung wurden große Mengen von Ammoniak freigesetzt. Der Ammoniakgehalt nahm im Verlauf der Abbauprozesse relativ zu, dadurch kam es zu einer Alkalisierung, die die keratinolytische Aktivität von Mikroorganismen begünstigte.

4. Die Veränderung des pH-Wertes während der Kompostierungsvorgänge:

Die Alkalisierungstendenz macht sich auch in einem deutlichen Anstieg des pH-Wertes, von 6,0 auf 7,8, bemerkbar. Die Ursache liegt in der starken NH_4 -Bildung.

5. Nachweis von Aminosäuren in Abhängigkeit von der Verrottungszeit:

Alle 10 Tage wurden die Extrakte von Torf-Federn-Gemisch mit Hilfe eines Membranfilters 0,15 μ steril filtriert und 10 ml davon auf Celluloseplatten aufgetragen und chromatographiert. Es wurde nach diesen Untersuchungen festgestellt, daß bis zum 40. Versuchstag kein deutlicher Nachweis von Aminosäuren zu erkennen war, während nach 50 Tagen Verrottungszeit folgende Aminosäuren auf Celluloseplatten nachgewiesen wurden: Valin, Leucin, Phenylalanin und Alanin. Von den beiden letzten Aminosäuren traten nur Spuren in schwacher Konzentration auf.

Tab. 10: Torf-Federmehl-Gemisch (1:1) im Selbsterhitzungsversuch

		Bestimmung nach					
		0	10	20	30	40	50
Temperatur in °C		23	67	66,5	62	55	55
pH-Wert		6,0	6,2	6,7	7,5	7,7	7,8
Wassergehalt in %		64	62	60	58	54	50
NH ₄ -Gehalt i.mg pro g Tr.Subst.		4,47	8,90	12,10	14,50	16,60	18,48
Ges.-N-Gehalt i.mg pro g Tr.Subst.		97,26	97,26	96,40	96,20	96,00	95,60
Leitfähigkeit in u/sim		1050	1250	1300	1650	2000	2500
Keimzahl pro g Tr.Subst.							
Bakterien 10 ⁶	Mesophil	10	20	40	50	60	80
	Thermophil	2	10	30	40	60	60
Pilze 10 ³	Mesophil	5	-	-	-	-	-
	Thermophil	2	4	-	-	-	-
Aktino- myceten 10 ³	Mesophil	7	-	-	-	-	-
	Thermophil	3	10	30	10	-	-

Gefäßeinwaage 440 g

Kompostierungsverfahren in der Temperaturdifferenzregelanlage
und in Weckgläsern

In einem weiteren Versuch wurden Torf und Federn in einem anderen Mischungsverhältnis 2:1 in Dewargefäßen bzw. Weckgläsern einer Selbsterhitzung überlassen. Dabei stieg die Temperatur nach 7 Tagen auf 75°C an, hielt sich auf dieser Höhe 24 Stunden, bevor sie langsam wieder abnahm (Abb. 9). Bei einem Mischungsverhältnis 1:1 wurde nach 5 Tagen eine Temperatur von 73°C erreicht (s. Tab. 11).

Bei den Federn stieg die Temperatur nach 6 Tagen nur auf 63°C an, und nahm danach relativ langsam ab. Während im Torf die Temperatur nach 40 Tagen auf 46°C anstieg und auch langsam abnahm.

Temperaturverlauf von Keratin-Material in Dewargefäßen

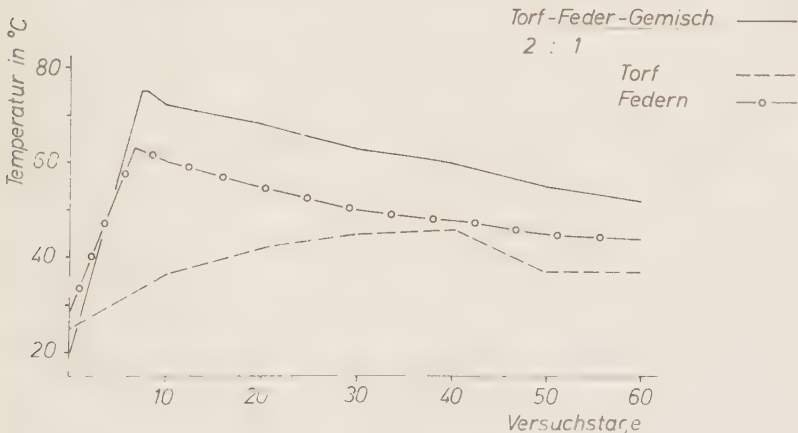


Abb. 9: Kurve für Dewargefäße

Tab. 11: Keratin. Material in Weckgläsern bzw. Dewargefäßen
nach 60 Tagen Versuchsdauer

	Weckgläser			Dewargefäße			Ausgangsmaterial		
	T+F	T	F	T+F	T	F	T+F	T	F
pH	6,7	6,2	6,8	6,9	6,0	8,0	4,8	4,2	5,3
H ₂ O-Gehalt in %	70	78	-	62	50	-	70	78	72
NH ₄ -Gehalt i. mg Tr. Subst.	15,2	5,2	37,3	15,8	4,1	49,0	4,0	1,12	9,0
Ges.-N-Gehalt i. mg pro g Tr. Subst.	-	-	-	-	-	-	36,5	3,9	123
Leitfähigkeit i. u/ Sim.	2700	600	80000	2850	165	13000	1050	200	650
Keimzahl pro g Tr. Subst.									
Bakterien 10 ⁶									
Mesophil	100	6	1	-	1	1	4	10	20
Thermophil	100	1	-	50	6	1	1,4	1	1
Aktinomyceten 10 ³									
Mesophil	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Thermophil	3	1	-	30	-	-	2	-	1
Pilze i. 10 ³									
Mesophil	-	-	-	-	-	-	200	200	100
Thermophil	-	10	-	-	-	-	-	-	-

Gefäßeinwaage 600 g

1. Beziehung zwischen Rottetemperatur und Keimzahl:

Die Zahl der thermophilen Bakterien ist im Torf-Feder-Gemisch erheblich angestiegen, von 1,4 Mill. im Ausgangsmaterial, bis zu 50 Mill. im Dewargefäß und im Weckglas bis zu 100 Mill. Im Torf bzw. Federn war kein entsprechender Anstieg feststellbar. Die Keimzahl von thermophilen Aktinomycceten im Gemisch vermehrte sich in beiden Versuchsanordnungen um das 15fache. Diese Aktinomycceten sind zum größten Teil verantwortlich für den Abbau des Federmehls. Andererseits sind thermophile Aktinomycceten im Torf bzw. Federn in Weckgläsern und Dewargefäßen nach 60 Tagen Verrottung nicht nachzuweisen. Nur bei Torf in Weckgläsern wurden Keimzahlen bis zu 10.000 bestimmt. Aus dem Gemisch wurde Th. vulgaris isoliert; dieser Organismus wurde am häufigsten gefunden und später auf die Fähigkeit des Keratinabbaus im Fermenter geprüft.

2. Der Ammoniakgehalt in Abhängigkeit von den Abbauvorgängen:

Auch der Ammoniakgehalt nahm in den verschiedenen Varianten während der Kompostierung wesentlich zu.

Bei den Weckgläsern und Dewargefäßen			
im Torf-Feder-Gemisch um etwa das 4fache			
im Torf	"	"	3-4 "
in Federn	"	"	4-5 "

gegenüber dem Ausgangsmaterial. Der Anstieg des Ammoniaks ist ein Beweis für den Abbau des Federmehls während der Rotte.

3. Das Verhältnis zwischen Keratinabbauprodukten und Leitfähigkeit:

Je mehr Federabbauprodukte freigesetzt werden, um so höher steigt die Leitfähigkeit in den Extrakten während der Kompostierung (60 Tage) an: Im Torf-Feder-Gemisch-Extrakt um das 2,8fache in Dewargefäßen und um das 2,7fache in Weckgläsern. Im Federextrakt betrug der Anstieg das 20fache in Dewargefäßen und mehr als das 120fache in Weckgläsern. Die erhöhte Leitfähigkeit wird als Beweis für die Abbaufähigkeit des Keratins angesehen, dessen Abbauprodukte im Laufe der biologischen Prozesse entstanden sind.

4. Veränderung des pH-Wertes während der Rotte:

Zwischen pH-Wert und der Intensität des Keratinabbaues besteht offensichtlich ein Zusammenhang. Ein pH-Anstieg übt eine erhebliche Wirkung auf die Rotte und Quellung des Keratins aus. Bemerkenswert ist der steile Anstieg des pH-Wertes bei Federn in Dewargefäßen von pH 5,3 auf pH 8.

5. Aminosäure-Nachweis:

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ließen sich in Extrakten von Torf-Feder-Gemisch, Torf und Federn folgende Aminosäuren identifizieren (s. Tab. 12).

Tab. 12: Aminosäuren im kompostierten Material

	Torf	Feder	Torf-Feder-Gemisch
Ausgangsmaterial	keine Aminosäuren		
Dewargefäß	keine Aminosäuren	Arginin Asparaginsäure Glutaminsäure Serin (?)	Alanin Leucin Valin
Weckglas	keine Aminosäure	Arginin Asparaginsäure Glutaminsäure Serin Alanin Histidin	Alanin Leucin Valin

Da die Aminosäuren auf den Chromatogrammen dicht nebeneinander erschienen, wurde auf eine quantitative Bestimmung verzichtet. Man darf annehmen, daß die löslichen Aminosäuren nur nach einer bestimmten Verrottungsperiode auftreten und in kurzer Zeit wieder biologisch umgesetzt werden. Wegen der unterschiedlichen

Versuchsbedingungen bei den Varianten konnten Ergebnisse nicht direkt verglichen werden. Es war aber deutlich zu erkennen, daß durch die biologische Aktivität im Torf-Feder-Gemisch während der Kompostierung verschiedene Zwischenprodukte wie Aminosäuren und Ammoniak in höheren Konzentrationen in den Extrakten angereichert wurden.

6. Die Bestimmung der gesamten reduzierenden Kohlenhydrate:

Unter den Keratinabbauprodukten werden auch reduzierende Zucker nachgewiesen nach NEISH (1952) und ihr Gehalt photometrisch bestimmt (s. S. 20). Die Ergebnisse wurden in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tab. 13: Reduzierende Zucker in mg je 10 g Trockensubstanz nach 60 Tagen

	Torf-Feder-Gemisch	Federn
Ausgangsmaterial	0,16	0,12
in Dewargefäßen	16,0	4,1
in Weckgläsern	2,8	3,5

Aus dieser Analyse geht deutlich hervor, daß die gesamten reduzierenden Kohlenhydrate im Extrakt (Torf u. Federn) in Dewargefäßen ca. 6 mal gegenüber Weckgläsern und 100 mal gegenüber dem Ausgangsmaterial angestiegen sind. Diese höhere Konzentration an reduzierenden Kohlenhydraten zeigt, daß die biologische Umsetzung des Keratins in Dewargefäßen wesentlich aktiver ist als in Weckgläsern. Diese kohlenhydrathaltigen Abbauprodukte stehen nach der Rotte den Pflanzen und Mikroorganismen als Nähr- oder Wirkstoffe zur Verfügung.

B. Wirkung von Keratin-Abbauprodukten

1. auf Mikroorganismen

Es wurde hier der Versuch unternommen, die Wirkung von Keratin-abbauprodukten auf Testmikroorganismen mit Hilfe der Bioautographie zu veranschaulichen. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Celluloseplatten 10x10 cm mit einer Schichtdicke von 0,10 mm verwendet. Als Testmikroorganismen wurden anfangs Escherichia coli, Bacillus mycoides, B. stearothermophilus und B. subtilis geprüft. Da B. subtilis relativ gleichmäßig wächst, wurden die weiteren Untersuchungen mit diesem Organismus durchgeführt. Eine bioautographische Methode nach LOUIS (1972) und VLADIMIR (1973) wurde etwas modifiziert. Für die Bioautographie wurde vorsichtig das lufttrockene Chromatogramm direkt, ohne Zwischenlage eines Filtrierpapiers auf einen beimpften Nährboden gelegt und eine Stunde darauf belassen, um die identifizierten Substanzen in dem beimpften Nährboden diffundieren zu lassen. Die Celluloseplatten wurden dann mit Hilfe eines Spatels abgehoben und die Petrischalen 24 Stunden bei 25°C bebrütet.

Folgende Substanzen wurden mit Hilfe dieser Methode geprüft:

1. Kulturlösung von K. ajelloi wurde nach 14 Tagen Wachstum im Fermenter steril filtriert und im Rotationsverdampfer 50:1 eingengt.
2. Kulturlösung von Th. vulgaris nach 11 Tagen im Fermenter bei 55°C steril filtriert und ebenfalls 50:1 eingengt.
3. Extrakt von Torf-Feder-Gemisch nach 50 Tagen Selbsterhitzung.
4. Extrakte von Torf-Feder-Gemisch, Torf und Federn in Dewargefäßen bzw. Weckgläsern nach 60 Tagen Verrottung.
Da nicht alle in der Lösung vorhandenen Substanzen getrennt werden konnten, wurden hier nur Aminosäuren und Indolderivate als eine Art von Keratinabbauprodukten nachgewiesen und mit Hilfe bioautographischer Verfahren auf Testmikroorganismen überprüft.

Ergebnisse:

- a) Keratinabbauprodukte in Reinkultur: Im Kulturfiltrat von K. ajelloi wurden die Aminosäuren aufgetrennt und bioautographisch mit B. subtilis getestet (Abb. 10).

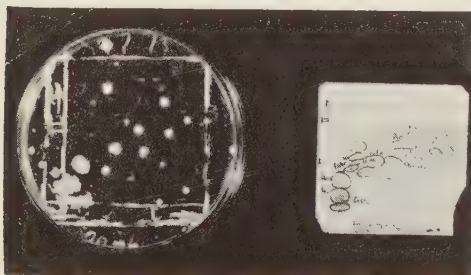


Abb. 10: Links: Wachstum von B. subtilis im bioautographischen Verfahren (Aminosäuren)

Rechts: Vergleichsplatte: Dünnschicht-Chromatogramm vom Kulturfiltrat von K. ajelloi

An den Ninhydrin-positiven Stellen war ein stärkeres Wachstum zu beobachten; besonders deutlich sind die Kolonien am Startpunkt gewachsen. Bei folgenden Aminosäuren traten starke Kolonien auf: Cystin, Histidin, Glutaminsäure, Valin, Threonin, Alanin, Phenylalanin und Leucin. An anderen Stellen, an denen keine Aminosäuren erkennbar waren, sind ebenfalls Bakterienkolonien gewachsen. Diese Kolonien sind wahrscheinlich unter der Wirkung von anderen aktiven Stoffen z. B. Indol-Derivaten, gebildet worden.

Mit Strept. fradiae ließ sich wegen der Schleimbildung in der Fermenterkultur diese Art des Nachweises von Aminosäuren und anderen Abbauprodukten nicht durchführen. Die Untersuchungen

des Kulturfiltrates von Th. vulgaris ergaben ebenfalls eine Koloniebildung, besonders im Aminosäuren-positiven Bereich. Das Bakterienwachstum unter der Wirkung von Th. vulgaris - Filtrat war relativ schwach im Vergleich zu der des Kulturfiltrats von K. ajelloi, obwohl die Präparationsbedingungen bei beiden Kulturfiltraten gleich waren. Entweder kam es bei Th. vulgaris nur zu einem geringen Keratinabbau und entsprechend niedrigen Aminosäurenkonzentrationen oder aber die entstandenen Aminosäuren werden bereits in andere Verbindungen umgewandelt. In ähnlicher Weise werden auch Indolderivate als Keratin-Abbauprodukte nachgewiesen und getestet (Abb. 11):

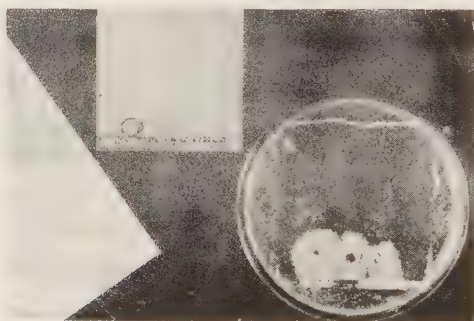


Abb. 11: Wachstum von B. subtilis im bioautographischen Verfahren (Indolverbindungen)

- Links: Torf-Federn-Gemisch Extrakt n. 50 Tagen Verrottung im Dewar-Gefäß
Mitte: Kulturfiltrat von Th. vulgaris n. 11 Tagen im Fermenter
Rechts: Kulturfiltrat von K. ajelloi n. 14 Tagen im Fermenter

Im Kulturfiltrat von K. ajelloi wurden nur Spuren von Indolderivaten nachgewiesen. Das Wachstum von B. subtilis war auf diesen Platten durchaus mit denen auf den Kontrollen vergleich-

bar und zeigte keine Unterschiede. Im Kulturfiltrat von Th. vulgaris wurden deutlich angefärbte Indolderivate nachgewiesen, die bioautographische Entwicklung zeigte an diesen Stellen eine deutliche Hemmung von B. subtilis. Am Startpunkt waren viele Kolonien dicht nebeneinander zu sehen, deren Entwicklung wahrscheinlich auf nicht vollkommen abgebaute Keratinsubstanzen zurückzuführen ist. Diesen Beobachtungen liegt die Annahme zugrunde, daß der höhere Anteil an Indolderivaten im Kulturfiltrat von Th. vulgaris eine Hemmwirkung ausübt, während die niedrige Konzentration im Kulturfiltrat von K. ajelloi nicht zu einem wirklichen Unterschied im Wachstum der Bakterien führte. Die Keratinabbauprodukte, die durch verschiedene Mikroorganismen im Kulturfiltrat freigesetzt wurden, reagieren und wirken unterschiedlich auf die Förderung oder Hemmung von Bakterien, je nach Gehalt und Konzentration von Aminosäuren und Indolderivaten.

b) Keratinabbauprodukte in Mischkultur nach Kompostierung:

Bei dem ersten Versuch in der Temperaturdifferenzregelanlage mit einem Torf-Feder-Gemisch (1:1) wurde im Abstand von je 10 Tagen ein Gefäß herausgenommen und Extrakte dieses Gemisches hergestellt.

Im Chromatogramm auf Celluloseplatten ließen sich in diesen Extrakten bis zum 40. Versuchstag keine Aminosäuren nachweisen.

Nach 50 Tagen Selbsterhitzung wurden 3-4 Aminosäuren beobachtet: Asparagin, Leucin, Alanin und Phenylalanin, letztere nur in Spuren. Bei der Bioautographie wurde besonders im Bereich von Alanin und Leucin eine deutliche Kolonie-Bildung erkannt, während bei Asparagin kein verstärktes Wachstum zu sehen war (Abb. 12). Die Wirkung von Aminosäuren auf das Bakterienwachstum ist unterschiedlich. Es ist durchaus möglich, daß manche Aminosäuren während der Bebrütungsdauer bei 25°C weiter diffundieren und somit einen spezifischen Wachstumseffekt nicht mehr erkennbar machen. In einem Wiederholungsversuch wurde die physiologische Wirkung der Extrakte von Torf, Federn und Torf-Feder-Gemisch,

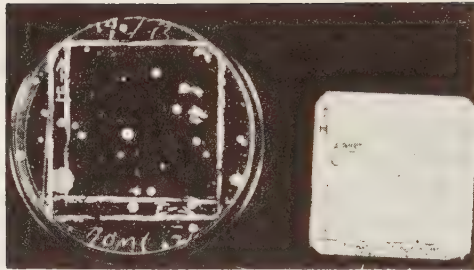


Abb. 12: Links: Wachstum von B. subtilis im bioautographischen Verfahren (Aminosäuren)

Rechts: Vergleichsplatte: Dünnschicht-Chromatogramm von Torf-Federn-Gemisch (Extrakt) nach 50 Tagen Kompostierung

die in Dewargefäßen und Weckgläsern gelagert waren, auf Testmikroorganismen geprüft. Als Kontrolle diente Ausgangsmaterial von den oben genannten Varianten vor der Verrottung. Folgende Beobachtungen wurden registriert:

Im Ausgangsmaterial waren in allen Extrakten keine Aminosäuren nachweisbar. Auch eventuell auftretende Indolverbindungen waren in ihrer Wirkung auf das Bakterienwachstum gleich denen der Kontrolle. Im Torfextrakt aus Weckgläsern war keine Aminosäure nachzuweisen.

1. Bei den Extrakten aus Dewargefäßen:

Im Federextrakt war eine Hemmzone an den Stellen zu sehen, an denen die Aminosäuren angefärbt waren. Wahrscheinlich traten die Aminosäuren im Federextrakt in so hoher Konzentration auf, daß sie eine Wachstumshemmung verursachten. Im Extrakt von Torf-Feder-Gemisch war eine deutliche Koloniebildung im Bereich der Aminosäuren feststellbar.

Im Torfextrakt war kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu bemerken. Im Federextrakt treten relativ viele Kolonien im Bereich der Indolderivate auf. Diese deutliche Förderung auf das Bakterienwachstum ist wahrscheinlich auf die niedrige Konzentration der Indol-Derivate, besonders der Indol-Essigsäure, zurückzuführen. Im Extrakt vom Torf-Feder-Gemisch wurde eine schwache Konzentration nachgewiesen, entsprechend war eine Förderung des Bakterienwachstums feststellbar. Im Torfextrakt waren keine Indol-Derivate vorhanden und auch keine nennenswerte Förderung oder Hemmung nachweisbar.

2. Bei Extrakten aus Weckgläsern:

Im Federextrakt war eine totale Hemmung zu finden. Im Extrakt aus dem Torf-Feder-Gemisch waren nur wenige Kolonien im Vergleich zur Kontrolle gebildet. Im Torfextrakt gab es keine Unterschiede. Diese traten besonders im Bereich der Indolylessigsäure auf.

Aus diesem Resultat geht hervor, daß die hohen Konzentrationen an Aminosäuren im Federextrakt aus den beiden Verfahren zur totalen Hemmung des Bakterienwachstums führen kann, wobei sich eine schwache Konzentration an Indol-Derivaten auf das Bakterienwachstum fördernd auswirkt. Aufgrund dieser Versuche darf man annehmen, daß die Konzentrationen an Aminosäuren und Indol-Derivaten in Extrakten aus Torf-Feder-Gemisch zu der Wachstumsförderung führen.

Die Tatsache, daß die Keratinabbauprodukte einen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum (ähnlich wie Wuchs- und Nährstoffe) ausüben können, wurde hier allgemein bestätigt.

2. Auf das Pflanzenwachstum

a) Gartenkresse

Für diesen Wachstumsversuch ist nach früheren Erfahrungen von anderer Seite die bekannte, leicht keimende und schnellwüchsige Gartenkresse (Lepidium sativum L.) als Testobjekt besonders gut geeignet. Als Vorversuch wurde ein Extrakt vom Torf-Feder-Gemisch nach 50 Tagen Rotte in der Temperaturdifferenzregelanlage geprüft. Um die physiologische Wirkung der Federkeratinabbauprodukte nach der Rotte erfassen zu können, wurden zwei Konzentrationen von dem Extrakt hergestellt. Als Kontrolle diente Torfextrakt ohne Behandlung, Extrakt vom Torf-Feder-Gemisch vor der Rotte, bzw. dest. H₂O.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 und Abb. 13 zusammengestellt.

Wirkung von Extrakt (Torf-Feder-Gemisch auf Gartenkresse)
nach 50 Tagen Verrottung in Dewargefäßen

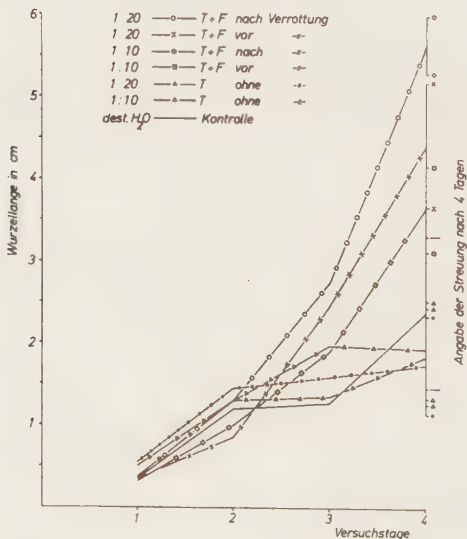


Abb. 13: Torf-Federn-Gemisch nach 50 Tagen

Tab. 14: Die Wirkung des Extraktes vom Torf-Feder-Gemisch nach 50 Tagen Verrottung auf die Wurzellänge in cm von Gartenkresse

Verdünnungs- grad	Torf-Feder-Gemisch nach Verrottung				Torf		H ₂ O
	1:20	1:10	1:20	1:10	1:20	1:10	
1. Versuchs- tag	0,39	0,59	0,35	0,30	0,5	0,42	0,34
2. "	1,27	1,42	0,85	1,08	1,01	1,28	1,20
3. "	2,77	1,59	2,47	1,90	1,98	1,36	1,28
4. "	5,60 +0,38	1,75 +0,66	4,45 +0,78	3,68 +0,56	1,93 +0,67	1,83 +0,61	2,43 +0,94

Die Wurzellänge wurde täglich auf Millimeterpapier gemessen und der Durchschnittswert von je 10 Samen angegeben. Aus diesem Versuch läßt sich erkennen, daß der Extrakt des Torf-Feder-Gemisches nach 50 Tagen Verrottung in Dewargefäßen im Vergleich zum Extrakt von Torf-Feder-Gemisch vor der Rotte in bestimmten Konzentrationen eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von Gartenkresse ausübt. Das destillierte Wasser hat sich als Kontrolle nicht gut bewährt. Eine Giftwirkung des gewöhnlichen destillierten Wassers wird auf Spuren von Kupfer und Zinn aus den Destillationsanlagen zurückgeführt. Deshalb wurde bei den weiteren Versuchen doppelt destilliertes Wasser verwendet. In dem zweiten Versuch wurden Extrakte von Torf-Feder-Gemisch und Federn aus Dewargefäßen bzw. Weckgläsern nach 60 Tagen Verrottung bzw. ohne Verrottung in vier Konzentrationen (1:5, 1:10, 1:25, 1:50) geprüft. Hier sollte eine mögliche Beziehung zwischen der Konzentration der Keratinabbauprodukte und deren Wirksamkeit auf das Kressewachstum festgestellt werden.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 15 - 20 und den Abbildungen 14 und 15 zusammengestellt.

Tab. 15: Ausgangsmaterial Wurzellänge in cm

Wuchstag	Extr.	Torf + Federn				Feder				Torf				Kontrolle	
		Verd.	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25		1:50
			1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	doppel.dest.H ₂ O
1.		1,60	1,58	0,41	0,40	1,69	1,59	0,45	0,46	1,44	1,84	0,32	0,38		0,42
2.		3,00	2,80	1,65	1,39	3,70	3,60	1,20	1,60	2,60	3,70	1,62	1,68		1,35
3.		4,70	3,40	3,50	3,48	4,40	5,30	2,80	3,80	3,70	5,40	3,34	3,23		2,65
4.		4,70	4,70	5,29	5,38	6,03	6,14	6,19	5,64	3,70	6,10	5,57	5,65		5,10

Tab. 16: Dewargefäße nach 60 Tagen Selbsterhitzung
Wurzellänge in cm

Wuchstag	Extr.				Torf + Federn				Feder				Torf				Kontrolle	
	Verd.	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	doppel.dest.H ₂ O
1.		0,37	0,48	0,37	0,29	-	-	-	-	0,07	1,25	1,01	0,36	0,33				0,42
2.		0,49	2,64	1,37	1,29	-	-	0,10	0,22	4,00	4,10	1,49	1,39					1,35
3.		0,91	4,40	3,80	3,49	-	-	0,10	0,21	4,80	4,70	3,32	3,24					2,65
4.		1,01	4,70	6,47	5,86	-	-	0,05	0,11	4,80	6,20	6,25	6,15					5,10

Tab. 17: Weckgläser nach 60 Tagen bei 60°C Bebrütung
Wurzellänge in cm

Versuchs- tag	Extr. Verd.	Torf + Federn			Feder			Torf			Kontrolle			
		1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	1:5	1:10	1:25	1:50	doppel.dest.H ₂ O
1.		1,17	1,27	0,31	0,30	-	-	0,08	0,13	1,33	1,4	0,39	0,30	0,42
2.		2,40	2,40	1,41	1,54	-	-	0,17	0,23	2,70	3,0	1,08	1,40	1,35
3.		3,50	3,90	3,03	2,84	-	-	0,10	0,24	3,6	3,47	3,7	3,90	2,65
4.		4,50	4,70	6,50	5,54	-	-	0,13	0,24	4,60	3,90	4,90	4,40	5,10

Tab. 18: Zuwachsrate bei Ausgangsmaterial

Wurzellänge in cm

Verd.	1 : 5		1 : 10		1 : 25		1 : 50		Kontrolle				
Versuchs- tag	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T				
Extr.	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T				
1.	1,60	1,69	1,44	1,58	1,59	1,84	0,41	0,45	0,32	0,40	0,46	0,38	0,42
2.	1,40	2,01	1,16	1,22	2,01	1,86	1,24	0,75	1,30	0,99	1,14	1,30	0,73
3.	1,70	0,70	1,10	0,60	1,70	1,70	1,85	1,60	1,72	2,09	2,20	1,55	1,30
4.	-	1,63	-	1,30	0,84	0,70	1,79	3,39	2,23	1,90	1,84	2,42	2,45
Gesamt- zuwachsrate	4,70	6,03	3,70	4,70	6,14	6,10	5,29	6,19	5,57	5,38	5,64	5,65	5,10

Tab. 19: Zuwachsrates bei DewargefäÙen nach 60 Tagen Selbsterhitzung
Wurzellänge in cm

Versuchs- tag	1 : 5			1 : 10			1 : 25			1 : 50			Kontrolle doppel. dest. H ₂ O
	Extr.	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T
1.	0,37	-	1,25	0,48	-	1,01	0,37	-	0,36	0,29	0,07	0,33	0,42
2.	0,12	-	2,75	2,16	-	3,09	1,0	0,10	1,13	1,00	0,15	1,06	0,93
3.	0,42	-	0,80	1,76	-	0,60	2,43	-	1,83	2,20	-0,01	1,85	1,30
4.	0,10	-	-	0,30	-	1,50	2,67	0,05	2,93	2,37	0,10	2,91	2,45
Gesamt- zuwachsrate	1,01	-	4,80	4,70	-	6,20	6,47	0,05	6,25	5,86	0,11	6,15	5,10

Tab. 20: Zuwachsrates bei Weckgläsern nach 60 Tagen Bebrütung 60°C

Wurzellänge in cm

Versuchs- tag	1 : 5				1 : 10				1 : 25				1 : 50				Kontrolle doppel. dest. H ₂ O
	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T	T+F	F	T	T	
1.	1,17	-	1,33	1,27	-	1,4	0,31	0,08	0,39	0,30	0,13	0,30	0,42				
2.	1,23	-	1,37	1,13	-	1,6	1,10	0,09	0,69	1,24	0,10	1,10	0,93				
3.	1,10	-	0,90	1,5	-	0,47	1,62	-0,07	2,62	1,30	0,01	2,50	1,30				
4.	1,10	-	1,00	0,8	-	0,43	3,47	0,03	1,20	2,70	-	0,50	2,45				
Gesamt- zuwachsrates	4,5	-	4,60	4,70	-	3,90	6,50	0,13	4,90	5,54	0,24	4,40	5,10				

Gartenkresse als Keimtest

Gesamtzuwachsrate nach 4 Tagen Wurzelwachstum in Abhängigkeit von Konzentration

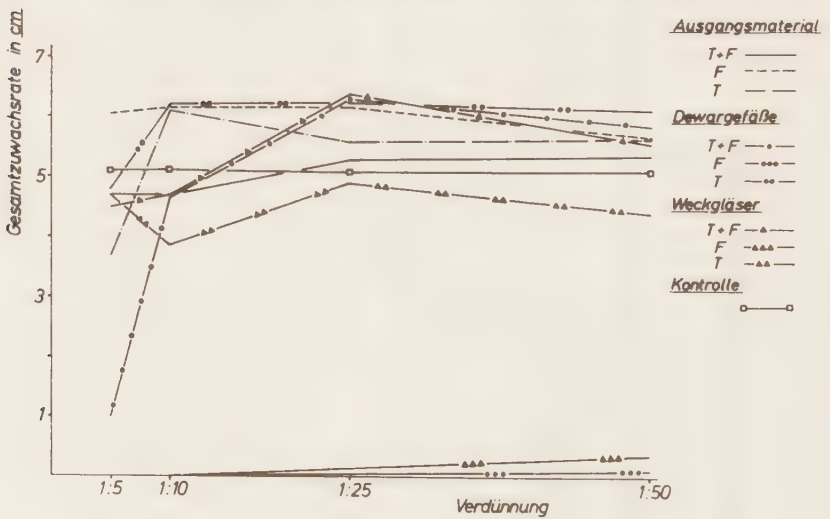


Abb. 15

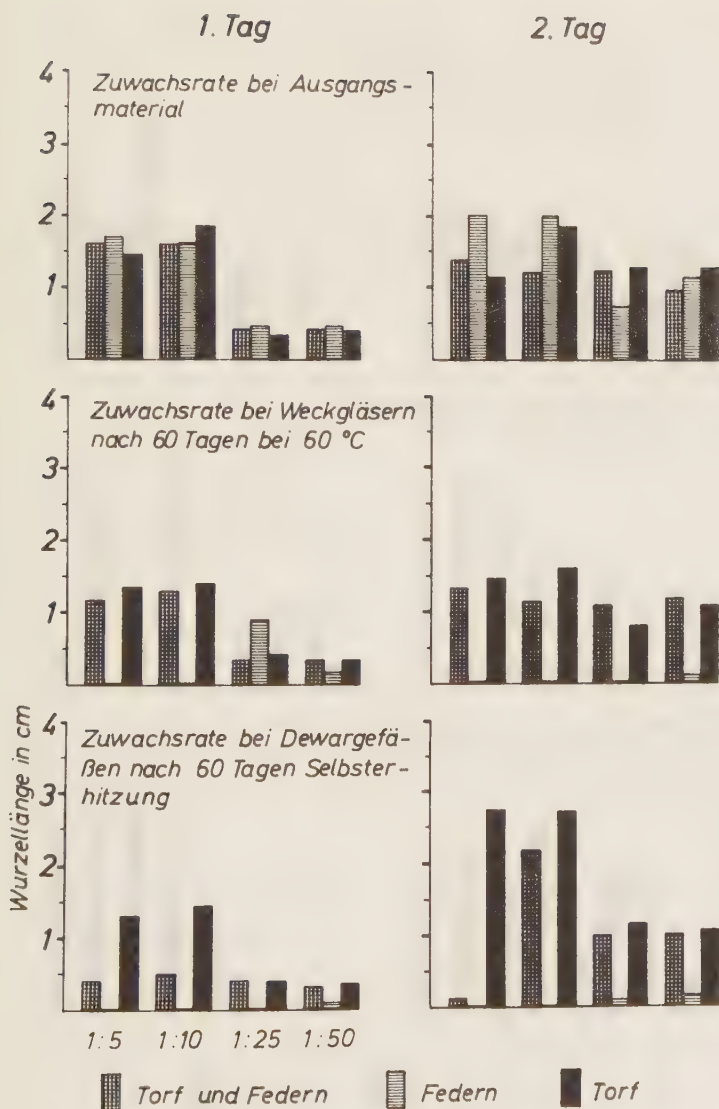
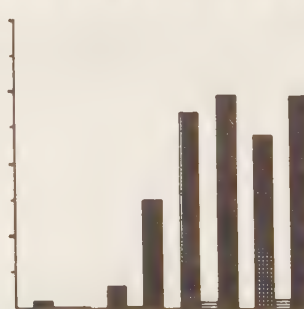
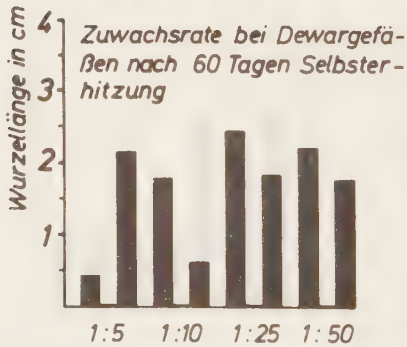
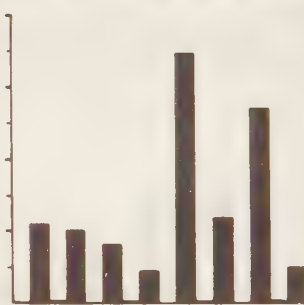
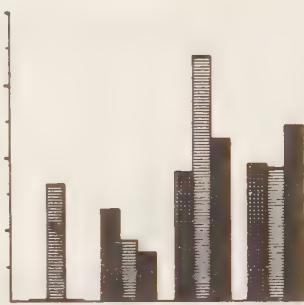


Abb. 14

3. Tag

4. Tag



Torf und Federn



Federn



Torf

Torf / Federn: Dewargefäß, bei 1:25 Verdünnung Zuwachsraten ab 3. Tag erheblich höher, bei 1:50 Zuwachsraten ab 3. Tag höher.
Weckglas, bei 1:25 Verdünnung Zuwachsraten ab 4. Tag doppelt so hoch, bei 1:50 Zuwachsraten ab 3. Tag deutlich höher.

Beim Vergleich der Extrakte aus Dewargefäßen bzw. Weckgläsern mit denen des Ausgangsmaterials, kommt man zu der interessanten Beobachtung, daß bei der Verdünnung (1:25) die täglichen Zuwachsraten ab 3. Versuchstag deutlich und manchmal erheblich höher lagen.

Die höchsten Werte für die Wurzellänge war bei 1:25 Verdünnung nach 4 Tagen deutlich festzustellen. In 1:5 und 1:10 Verdünnung war eine Hemmwirkung gegenüber Ausgangsmaterial und Kontrolle nachweisbar. Diese Hemmung war in Extrakten von Torf und Federn aus Dewargefäßen stärker als aus Weckgläsern. Die Extrakte von Torf-Feder-Gemisch nach 60 Tagen Verrottung im Kompostierungsverfahren führte in bestimmten Konzentrationen zu einer Förderung des Kressewachstums. Diese Förderung ist wahrscheinlich auf freigesetzte Nähr- und Wachstumsstoffe während der Kompostierung und biologischen Umsetzung des Federkeratins zurückzuführen. Im Federextrakt aus dem unverrotteten Ausgangsmaterial war ein normales gegenüber der Wasser-Kontrolle relativ besseres Wurzelwachstum festzustellen. Ursache dafür können die Begleitstoffe im Federextrakt sein, die im Extrakt in löslicher Form vorliegen.

Torfextrakte reagierten je nach ihrer Konzentration unterschiedlich. Es wurde festgestellt, daß Torfextrakt aus Dewargefäßen gegenüber Torfextrakt vor der Rotte (in 1:25 und 1:50 Verdünnung) zu einer schwachen Förderung des Kressewachstums führte. Dagegen neigte die Wachstumskurve unter der Wirkung von Torfextrakt aus Weckgläsern zu einer schwachen Hemmung in allen Konzentrationen. Diese Förder- bzw. Hemmwirkung auf das Kressewachstum wird auf eine unterschiedliche biologische Umsetzung in beiden Fällen zurückgeführt. Zur besseren Darstellung werden die täg-

lichen Zuwachsraten in der Wurzellänge berechnet (Tab. 18 - 20, Abb. 14 u. 15).

Die Abb. 15 stellt das Wurzelwachstum nach 4 Tagen in allen Extrakten und bei verschiedenen Konzentrationen dar. Wie aus den Kurven hervorgeht, erreichte die gesamte Zuwachsrate in Extrakten von Torf-Feder-Gemisch aus Dewargefäßen und Weckgläsern bei 1:25 Verdünnung gegenüber Extrakten aus dem Ausgangsmaterial den höchsten Wert. Hier beträgt die Differenz 1,21 cm, d. h. etwa 20 %, wobei in den 1:5 und 1:10 Verdünnungen keine bemerkenswerten Unterschiede gegenüber dem Ausgangsmaterial festzustellen waren. Die Federextrakte aus den beiden Verfahren zeigten in allen Verdünnungen eine totale Hemmung, während der Federextrakt aus dem Ausgangsmaterial zu normalem Wachstum führte. Im Torfextrakt des Ausgangsmaterials erreichte die gesamte Zuwachsrate den höchsten Wert von ca. 1,0 cm bei der hohen Konzentration von 1:20. Dieses Ergebnis führte zu dem Schluß, daß die freigesetzten Nähr- und Wuchsstoffe nach einer bestimmten Verrottungszeit besonders im Torf-Feder-Gemisch eine Wirkung auf das Pflanzenwachstum ausübten. Diese Keratinabbauprodukte können, wie es bei vielen Hemmstoffen der Fall ist, in geringeren Konzentrationen fördernd wirken.

b) Auf Sonnenblumen:

Es bleibt nun die Frage offen, ob die Keratinabbauprodukte Nährstoff- oder Wuchsstoff-Wirkung besitzen oder ob sie die Umwandlung in Stoffen mit einem derartigen Effekt auslösen. Über die Notwendigkeit der Aminosäuren und anderer Nährstoffe, wie Stickstoff, Schwefel, Phosphor, Eisen, Mangan, Magnesium und Kupfer, die in den keratinhaltigen Substanzen vorkommen, besteht heute kein Zweifel. Mit den hier berichteten Versuchsergebnissen soll ein Beitrag zu der Frage geleistet werden, ob die Keratinabbauprodukte einen günstigen Einfluß auf das Pflanzenwachstum ausüben.

Bei der Durchführung derartiger Untersuchungen ergab sich die Schwierigkeit, geeignete Standard-Substanzen zu finden.

Im 1. Versuch wurden die Kulturfiltrate von K. ajelloi und Strept. fradiae getestet gegenüber einer Wasserkontrolle (Tab. 21). In den weiteren Versuchen wurde nur noch das Kulturfiltrat von K. ajelloi verwendet. Als Vergleichslösungen dienten eine unbeimpfte Nährlösung und eine Lösung mit und ohne N, die entsprechend dem N,P,K-Gehalt des jeweiligen Kulturfiltrats zusammengesetzt war (N.P.K.- bzw. P.K.-Lösung). Die Dauer des Versuches betrug vier Wochen. Täglich wurden je 10 ml Kulturfiltrat/Gefäß bis zu einer Gesamtmenge von 40 bzw. 80 ml zugegeben. Danach wurde der Wasserverlust mit dest. H₂O ausgeglichen. Bereits 2 Wochen nach Versuchsbeginn waren die Pflanzen mit den beiden Kulturfiltraten kräftiger und höher im Wuchs als die Kontroll-Pflanzen. Selbst nach vier Wochen waren deutliche Unterschiede erkennbar. Erst bei höherer Zugabe (80 ml) von Kulturfiltrat von K. ajelloi fangen die Pflanzen an zu welken und sich zu krümmen.

Die Versuche mit Sonnenblumen wurden in Blumentöpfen angesetzt, die mit Filterpapier ausgelegt und mit 400 g Quarzsand (0,7-1,2 mm) gefüllt waren.

Folgende Mineralsalze wurden pro Gefäß zugegeben:

CaCO ₃	8 g	K ₂ SO ₄	4 g
MgCO ₃	1 g	H ₃ BO ₃	30 mg (gut aufgelöst i. 25 ml H ₂ O).
CaHPO ₄	4 g		

Nach Auskeimung wurden die Anzahl der Pflanzen bis auf drei reduziert. In diesem Versuch wurden 20 ml/Gefäß der Nährlösung nach MENGEL (s. Anhang Nr. 9) im Verlauf der Versuchsdauer zugegeben.

Diese Erscheinungen lassen sich auf die toxische Wirkung von Wuchs- oder Nährstoffen in höheren Konzentrationen zurückführen. Auch ein Phosphat-Mangel kann eine derartige toxische Wirkung verursachen. Durch den Stoffwechsel der Pilze während des Keratinabbaues wird ein großer Teil des Phosphats verbraucht. Die Werte für Trockensubstanz und Stickstoffgehalt bestätigen diese Annahme (s. Tab. 21).

Tab. 21: Wirkung der Kulturfiltrate von Streptomyces fradiae und Keratinomyces ajelloi auf Sonnenblumen im Gefäßversuch
30.7.1972 - 30.8.1972 (Vorversuch)

Varianten	Trockensubstanz			Ges.-N		
	Pfl.	Wurz.	Ges.T.S. in g	Pfl.	Wurz.	Ges.N in mg
Kontrolle H ₂ O	0,29	0,09	0,3	3,92	1,70	5,62
40 ml K.F. S. fradiae	0,45	0,23	0,68	5,60	2,10	7,70
80 ml K.F. S. fradiae	0,75	0,30	1,05	8,12	2,0	10,12
40 ml K.F. K. ajelloi	0,28	0,27	0,55	6,58	1,7	8,28
80 ml K.F. K. ajelloi	0,86	0,33	1,19	10,08	2,8	12,88
Kulturfiltrat in 10 ml	Ammoniak	Gesamt (N)	Ausgangsmaterial			
<u>Strept fradiae</u>	0,38 mg	1,12 mg	Hornspäne 1g pro Liter			
<u>K. ajelloi</u>	1,16 mg	2,10 mg	Hornspäne 2g pro Liter			

Tab. 22: Wirkung des Kulturfiltrats von Keratinomyces ajelloi
auf die Entwicklung von Sonnenblumen im Gefäßversuch
(9.9.1972 - 11.10.1972)

Varianten	Trockensubstanz			Ges.-N		
	Pfl.	Wurz.	Ges.T.S.	Pfl.	Wurz.	Ges.N.
1) Kontrolle H ₂ O	0,186	0,08	0,26	1,40	1,63	3,03
2) 30 ml K.F.	0,30	0,26	0,56	7,70	2,30	10,0
3) 60 ml K.F.	0,35	0,23	0,58	11,20	3,72	14,90
4) 30 ml (NL +300 mg Ker.)	0,27	0,40	0,67	7,0	2,91	9,5
5) 60 ml (NL + 600 mg Ker.)	0,471	0,44	0,91	2,60	3,10	15,7
6) 30 ml P.K.	0,161	0,18	0,34	2,24	1,50	3,74
7) 60 ml P.K.	0,192	0,15	0,34	4,2	0,7	4,9

Bemerkungen: Nährlösungen von P.K. betrugten 564 mg K₂HPO₄/L
+ 1,425 g KCl/L.

Da das schleimige Kulturfiltrat von Strept. fradiae nur sehr schwer durch Membranfilter (0,15 μ) zu filtrieren war, wurde deshalb darauf verzichtet, dieses Kulturfiltrat weiterhin als Versuchsmaterial zu verwenden.

In einem weiteren Versuch wurde das Kulturfiltrat mit einer unbewachsenen Nährlösung mit Hornspänen bzw. P.K. in seiner Wirkung auf die Entwicklung von Sonnenblumen verglichen (s. Tab. 22, Abb. 16, 17, 18).



Abb. 16: Das Sonnenblumenwachstum bei 30 ml K.F. verschiedener Varianten nach 4 Wochen

von rechts nach links: H₂O-Kontrolle, Kulturfiltrat von K. ajelloi, Unbeimpftes Kulturfiltrat, P.K.

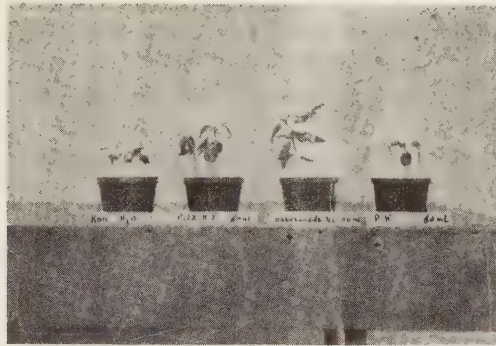


Abb. 17: Das Sonnenblumenwachstum bei 60 ml verschiedener Varianten n. 4 Wochen
von rechts n. links: H_2O Kontrolle, Kulturfiltrat von K. ajelloi, Unbeimpftes Kulturfiltrat, P.K.



Abb. 18: Die Wirkung des Kulturfiltrates von K. ajelloi auf das Sonnenblumenwachstum n. 4 Wochen
von rechts n. links: H_2O Kontrolle, 30 ml K.F., 60 ml K.F., 30 ml Unbeimpfte K.F., 60 ml Unbeimpfte K.F., 30 ml. P.K., 60 ml. P.K.

Nach drei Wochen waren bei den einzelnen Varianten folgende Unterschiede festzustellen:

- Nr. 1 (Kontrolle): Die Pflanzen waren durchschnittlich 4 cm groß, sie hatten bis zu drei Blätter mit gelblicher Farbe, die Stengel sahen schwach aus.
- Nr. 2 (30 ml Kulturfiltrat): Die Pflanzen sind gut gewachsen, dunkelgrün und kräftiger als die Kontrolle. Die Stengel waren 10 cm lang, ein viertes Blatt ist deutlich zu sehen.
- Nr. 3 (60 ml Kulturfiltrat): Ebenfalls gut gewachsen, die Blätter waren dunkler und breiter als bei Variante 2.
- Nr. 4 (30 ml Nährlösung): Die Pflanzen waren durchschnittlich 10 cm groß, die Farbe der Blätter war hellgrün bis gelb, die Stengel waren kräftiger als die der Kontrolle.
- Nr. 5 (60 ml Nährlösung): Die Pflanzen waren besser gewachsen als bei der Variante 4, zeigten aber gelbe Flecke auf den Blättern.
- Nr. 6 (30 ml PK) Nr. 7 (60 ml PK): Die Entwicklung war etwa gleich dem der Kontrolle, ein Stickstoffmangel war deutlich zu erkennen.

Vor der Ernte nach 4 Wochen wurden die Pflanzen noch einmal beobachtet.

- Nr. 1. Die Blätter hatten deutlich gelbe Flecke, das Wachstum war im allgemeinen schwach und die Stengellänge war unverändert.
- Nr. 2. Die Pflanzen waren kräftig und groß gewachsen, die Farbe der Blätter war grün, es waren kaum gelbe Flecke zu erkennen.
- Nr. 3. Das Wachstum war ähnlich wie bei Variante 2, auf den Blättern waren deutliche braune Flecke zu sehen, die Stengel waren schwach und leicht gekrümmt.

Nr. 4. Die Pflanzen waren im Vergleich zur Kontrolle relativ gut gewachsen, aber kürzer als bei Variante 2, desgleichen waren gelbe Flecke zu erkennen.

Nr. 5. Die Pflanzen waren sehr gut gewachsen, die Stengel waren bis zu 14 cm lang, die Blätter waren breiter als die der anderen Varianten und dunkelgrün.

Das könnte auf die freigesetzten Keratinabbauprodukte im Boden innerhalb von 4 Wochen zurückzuführen sein.

Nach Auswertung aller erfaßten Parameter, wie Stengellänge, Blattbreite, Blattfarbe, Trockensubstanz und Gesamt-N-Gehalt je ober- und unterirdischen Pflanzenteilen, darf man annehmen, daß durch die höhere Konzentration an zugegebenem Kulturfiltrat keine entsprechende Steigerung des Sonnenblumenwachstums auftrat. Die toxische Wirkung von Zwischenprodukten könnte dafür die Ursache sein.

Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigten sich nur geringe Unterschiede gegenüber der unbeimpften Nährlösung, wobei im höheren Konzentrationsbereich deutliche Unterschiede auftraten. Die höchste Wachstumsrate gemessen an der Trockensubstanz, trat bei der Variante 5 (Nährlösung + 600 mg Keratinsubstanz) auf, wahrscheinlich verursacht durch die größere Menge an verfügbaren Nährstoffen. Auch hier förderte nur eine bestimmte Konzentration des Kulturfiltrats die Entwicklung der Sonnenblumen wesentlich, wogegen bei höheren Konzentrationen eine erwartete Wachstumszunahme ausblieb, wie aus Tab. 22 und Abb. 16, 17, 18 zu ersehen ist.

Schließlich wurde in einem ähnlichen Versuch mit Sonnenblumen die Nährstoffwirkung des Kulturfiltrates von K. ajelloi mit einem synthetischen Kulturfiltrat verglichen.

Die chemische Zusammensetzung: Das Kulturfiltrat von K. ajelloi enthielt in 10 ml 3,2 mg Stickstoff, davon 2,82 mg NH_4 , 8,2 mg K, 2,59 mg P, der pH-Wert betrug 8,2.

Diesmal wurden die Blumentöpfe mit Plastikfolie anstelle von Filterpapier ausgelegt, um die ganze Wurzelmasse leicht herausheben zu können.

Dieser Versuch wurde im Gewächshaus bei Temperaturschwankungen zwischen 25°C und 32°C angesetzt. Nachdem nach 3 Tagen alle Sonnenblumensamen ausgekeimt waren, wurde damit begonnen, täglich 10 ml der verschiedenen Nährlösungen zu der entsprechenden Variante zu geben. In allen Varianten wuchsen die Pflanzen relativ schnell und kräftig, bereits nach 2 Wochen waren deutliche Unterschiede zwischen allen Varianten zu erkennen (Tab. 23, Abb. 19, 20, 21).

Bei den Varianten 1 und 2 mit 20 ml bzw. 40 ml NPK-Lösung sind die Pflanzen sehr gut und kräftig entwickelt, die breiten Blätter sind dunkelgrün gefärbt; im Vergleich zu den anderen Varianten machen die Pflanzen einen gesunden Eindruck. In den Varianten 3 und 4 (20 ml bzw. 40 ml Kulturfiltrat) waren die Pflanzen noch kräftig, aber hellgrün und kürzer als bei den NPK-Varianten. Während bei dem NPK-Kulturfiltrat 8 breite, dunkelgrüne Blätter gewachsen waren, kam es hier nur zur Ausbildung von 6 dünnen Blättern, die weniger intensiv gefärbt waren. Die beiden Varianten 7 und 8 (Nährlösung und Keratinsuspension) waren auch gut und kräftig gewachsen, aber die Farbe war noch heller grün und die Stengel waren kürzer im Vergleich zu den NPK-Varianten. Daraus ergibt sich, daß die fein gemahlene Hornspäne zum größten Teil innerhalb von vier Versuchswochen abgebaut werden.

Diese freigesetzten Hornkeratinabbauprodukte waren für die Pflanzen leicht verfügbar und aufnehmbar.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die Sonnenblumen den in Form von Ammoniumnitrat zugesetzten Stickstoff aufnehmen und zu ihrem Aufbau verwerten können.

Es ist anzunehmen, daß im Gegensatz zu diesem synthetischen Kulturfiltrat im Kulturfiltrat von K. ajelloi nur ein Teil des Keratins hydrolysiert wurde, also weniger löslicher N verfügbar war und zu einem geringeren Wachstum der Sonnenblumen führte.

Tab. 23: Wirkung des Kulturfiltrats von *Keratinomyces ajelloi* auf die Entwicklung von Sonnenblumen in Gefäßversuch (3.7.1973 - 3.8.1973 in Gewächshaus)

Varianten	Trockensubstanz			Ges.-N		
	Pfl.	Wurz.	Ges.T.S.	Pfl.	Wurz.	Ges.N.
1) 20 ml N.P.K	0,76	0,54	1,30	10,13	3,02	13,15
2) 40 ml N.P.K.	0,89	0,63	1,52	12,20	4,08	16,28
3) 20 ml K.F.	0,66	0,33	0,99	7,28	3,04	10,32
4) 40 ml K.F.	0,75	0,36	1,11	8,68	3,92	12,60
5) 20 ml P.K.	0,38	0,42	0,80	3,56	0,98	4,58
6) 40 ml P.K.	0,44	0,55	0,99	3,90	1,26	5,16
7) 20 ml (NL+Ker.) 200 mg	0,38	0,35	0,73	5,04	1,86	6,90
8) 40 ml (NL+Ker.) 400 mg	0,46	0,46	0,92	7,0	2,51	9,51

(N.P.K. Düngemittel 914 mg NH_4NO_3 , 1,45 g K_2HPO_4 und 320 mg KCl)



Abb. 19: Die Wirkung des Kulturfiltrates (K.F.) von K. ajelloi auf das Sonnenblumenwachstum im Vergleich zu N.P.K. (K.F.) bei 20 ml NL. Von rechts n. links: P.K., unbeimpfte K.F., K.F., N.P.K.



Abb. 20: Die Wirkung des Kulturfiltrates von K. ajelloi auf das Sonnenblumenwachstum im Vergleich zu N.P.K. (K.F.) bei 40 ml NL. Von rechts nach links: P.K., unbeimpfte K.F., N.P.K. (K.F.).

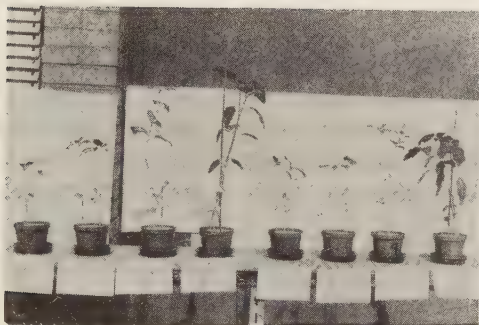


Abb. 21: Die Wirkung des Kulturfiltrates (K.F.) von K. ajelloi auf das Sonnenblumenwachstum im Vergleich mit N.P.K. (K.F.).
Von rechts nach links: 40 ml (P.K., unbeimpfte K.F., K.F., N.P.K. K.F.), 20 ml (P.K., unbeimpfte K.F., K.F., N.P.K. K.F.).

Nach vier Versuchswochen wurden die Unterschiede noch deutlicher und die Beobachtungen bekräftigen die Auffassung, daß die Sonnenblumen das synthetische Kulturfiltrat besser als Pilz-Kulturfiltrat verwerten können (s. auch Tab. 23).

Als letzter Versuch wurden 11 Varianten wie folgt vorbereitet, um eine vermutliche Wuchsstoff-Wirkung auf das Wachstum (Förderung oder Hemmung) nachzuweisen.

1. 20 ml N.P.K.
2. 40 ml N.P.K.
3. 20 ml K.F.
4. 40 ml K.F.
5. 30 ml N.P.K. + 10 ml K.F.
6. 20 ml N.P.K. + 20 ml K.F.
7. 10 ml N.P.K. + 30 ml K.F.

- 8. 20 ml P.K.
- 9. 40 ml P.K.
- 10. 20 ml Nährlösung + Keratinsuspension 200 mg
- 11. 40 ml Nährlösung + Keratinsuspension 400 mg

Nach vier Tagen waren alle Pflanzen gut ausgekeimt und wurden auf drei pro Gefäß reduziert. Die verschiedenen Nährlösungen wurden wie bisher in Mengen von je 10 ml pro Tag zugegeben und der Wasserverlust mit dest. H₂O ausgeglichen.

Nach 4 Wochen Wachstum wurden die entsprechenden Bestimmungen ausgeführt und die Ergebnisse wurden in Tabelle 24 und Abb. 22 zusammengestellt.



Abb. 22: Die Wirkung des Kulturfiltrates von K. ajelloi und N.P.K. (K.F.) in verschiedenen Mischungsverhältnissen auf das Sonnenblumenwachstum.
Von rechts nach links: 40 ml unbeimpfte K.F., 40 ml p. K., 40 ml N.P.K. (K.F.), 30 ml N.P.K. (K.F.) + 10 K.F., 20 ml N.P.K. (K.F.) + 20 ml K.F., 10 ml N.P.K. (K.F.) + 30 ml K.F.

Die Varianten 5, 6 und 7 waren wie die Variante 2 gut gewachsen, aber besonders bei den Varianten 6 und 7 machten sich deutliche Unterschiede bemerkbar, die Blätter waren breiter und intensi-

vergefärbt, die gesamte Trockensubstanz war geringfügig höher als bei der Variante 2 mit 40 ml NPK.

Obwohl die gesamte Trockenmasse bei den Varianten 5 und 6 (10 ml NPK + 0,05 g mehr war als bei der Variante 2 (40 ml NPK), übertraf der Stickstoffgehalt bei der Variante 2 um 2,75 mg pro Gefäß die der Varianten 5 und 6. Im allgemeinen waren die Pflanzen bei dem Gemisch in den Varianten 5 und 6 (30 ml KF + 10 ml NPK bzw. 20 ml KF + 20 ml NPK) relativ besser gewachsen, als bei den Varianten 2 (40 ml NPK) und 4 (40 ml K.F.).

Das Kulturfiltrat von K. ajelloi besitzt anscheinend in seinen Keratinabbauprodukten Wuchsstoffe, die eine solche Förderung auf das Sonnenblumenwachstum ausüben. Das wird erkennbar, wenn diese Keratinabbauprodukte in bestimmten Konzentrationen gegeben und mit einem synthetischen stickstoffhaltigen Kulturfiltrat in einem bestimmten Verhältnis gemischt werden.

Diese Wachstumsunterschiede werden nicht nur auf eine Nährstoffwirkung, sondern auf Komponenten mit Wuchsstoffcharakter zurückgeführt.

Tab.24: Wuchswirkung des Kulturfiltrats von *Keratinomyces ajelloi*
auf die Entwicklung von Sonnenblumen im Gefäßversuch
(3.7.1973 - 3.8.1973) in Gewächshaus

Varianten	Trockensubstanz			Ges.-N		
	Pfl.	Wurz.	Ges.T.S.	Pfl.	Wurz.	Ges.N.
1) 20ml N.P.K.	0,40	0,16	0,56	7,13	3,08	10,21
2) 40ml "	0,54	0,16	0,70	9,70	5,04	14,74
3) 20ml K.F.	0,28	0,19	0,47	6,60	2,80	9,40
4) 40ml "	0,43	0,14	0,57	8,40	3,92	12,32
5) 30ml K.F.+ 10ml N.P.K.	0,52	0,22	0,74	8,63	3,36	11,99
6) 20ml K.F.+ 20ml N.P.K.	0,50	0,26	0,76	8,45	3,50	11,95
7) 10ml K.F.+ 30ml N.P.K.	0,45	0,23	0,68	8,32	3,80	12,12
8) 20ml P.K.	0,21	0,14	0,35	3,40	0,98	4,38
9) 40ml "	0,28	0,18	0,46	3,73	1,26	4,99
10) 20ml (NL+Ker.200mg)	0,21	0,23	0,44	5,60	1,68	7,28
11) 40ml (NL+Ker.400mg)	0,30	0,26	0,56	6,76	2,52	9,28

Ein Liter synthetischer Kulturfiltrat enthält: 914 mg NH_4NO_3 ,
1,45 K_2HPO_4 , 320 mg KCl.

V. DISKUSSION

Heutzutage belasten an vielen Orten keratinhaltige Abfallprodukte die Umwelt und müssen kostengünstig beseitigt werden. Aus diesem Grunde wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Nähr- und Wuchsstoffwirkungen bei der Anwendung verschiedener keratinhaltiger Substanzen und deren Abbauprodukten, sowohl bei den einzelnen Pflanzen als auch bei Mikroorganismen auftreten. Die wachstumsfördernde Wirkung von Keratinabbauprodukten ist allgemein bekannt, jedoch bestehen noch gewisse Unklarheiten über die eigentlichen Ursachen dieser Wirkungen und die biochemischen Reaktionen beim Abbauprozess. Es wurde festgestellt, daß Aminosäuren und andere organische Säuren, als wesentliche Bestandteile der Keratinabbauprodukte, pflanzenphysiologisch wirksam werden.

Der Abbau von Keratin erfolgt in erster Linie auf biochemischem Weg durch Mikroorganismen. Diese Tatsache hat zur Folge, daß der Abbau von Keratin wie auch die physiologischen Wirkungen auf Pflanzen und Mikroorganismen stark von den jeweiligen ökologischen Bedingungen abhängig sind. Außerdem spielt hierbei der Entwicklungszustand der Pflanze eine große Rolle, da nur in bestimmten Entwicklungsstadien positive Wirkungen auftreten.

Keratin kann je nach Herkunft, wie aus chemischen Analysen und Röntgenogrammen hervorgeht, eine unterschiedliche chemische Struktur aufweisen. Dies hat zur Folge, daß bei den einzelnen keratinhaltigen Substanzen unterschiedliche pflanzenphysiologische Wirkungen zu erwarten sind.

Die bisherigen Forschungen über das Keratin und seinen Abbau sind meist von der Human- und Veterinärmedizin durchgeführt worden. Diese Wissenschaften untersuchten vorrangig die beim mikrobiellen Keratinabbau beteiligten Mikroorganismen sowie die pathologischen Erscheinungen bei Mensch und Tier.

Biologische Hydrolyse:

Der Keratinabbau durch Mikroorganismen ist ein sehr komplizierter Prozeß, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Die

Haarködermethode nach VANBREUSEGHEM (1959) erweist sich für die Isolierung zahlreicher keratinabbauender Mikroorganismen, hauptsächlich von Pilzen, als geeignet. In der freien Natur dienen keratinhaltige Substanzen, wie Federn und Hornspäne, vielen Mikroorganismen als alleiniges oder zusätzliches Nährsubstrat zur Deckung des Stickstoff- und Kohlenstoffbedarfs. Diese Skleroproteine sind als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle geeignet (DANIELS 1953, FISCHER 1959, SAEZ 1959, ROBERTS 1961).

Im allgemeinen ist die Haarködermethode (KARLING 1946, VANBREUSEGHEM 1952 und BENEDEK 1962) besonders geeignet zur Isolierung von keratinophilen Mikroorganismen, besonders von Pilzen. Bei der Isolierung traten der Pilz K. ajelloi und der Aktinomycet Strept. fradiae am häufigsten auf. Die Verwertung des Keratins erfordert aufgrund seines chemischen Aufbaues als sehr schwer spaltbares Eiweißsubstrat von den angreifenden Mikroorganismen eine vielseitige und dabei spezifisch orientierte enzymatische Potenz sowie einen anpassungsfähigen Bau- und Stoffwechsel. Die vorliegenden Untersuchungen über den Keratinabbau haben ergeben, daß K. ajelloi in der Lage ist, in 14 Tagen im Fermenter bis zu 75 % des vorgelegten Keratins abzubauen, während Strept. fradiae in 10 Tagen sogar bis zu 80 % des Keratins zersetzen kann. NOVAL und NICKERSON (1959) haben gezeigt, daß Strept. fradiae bis zu 84 % vom Wollkeratin in Schüttelkultur innerhalb von 11 Tagen abgebaut hat. MATHISON (1961) hat festgestellt, daß K. ajelloi 67 % des Wollkeratins innerhalb von 11 Tagen abbauen kann. In beiden Fällen enthält die Wolle mindestens bis zu 90 % Keratin am Anfang dieser Versuche. Diese Ergebnisse stimmen zum größten Teil mit denen von HEJTMANEK (1959) und MANDELS et al. (1948) überein, wobei ein direkter Vergleich wegen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht möglich ist.

MATHISON (1961) hat beim Wollabbau durch K. ajelloi gefunden, daß der pH-Wert in den Nährlösungen angehoben wird, vornehmlich durch NH_3 -Freisetzungen, die eine gewisse Relation zum Keratinabbau erkennen lassen. Ähnliche Beziehungen wurden auch in den eigenen

Versuchen beobachtet. Nach NOVAL und NICKERSON (1959) scheidet Strept. fradiae bei Wachstum auf Wolle oder Kükenfedern in einer mineralischen Basisnährlösung eine Keratinase aus, die Keratin hydrolysiert. Diese Fähigkeit von Strept. fradiae, Keratin abzubauen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit besonders in den Fermentkulturen bestätigt. Nach BURACK und KNIGHT (1958) sind Ammoniakfreisetzungen bzw. -ausscheidungen als Indikatoren für oxydative Desaminierungen durch Pilze zu betrachten.

Auf den Dünnschichtchromatogrammen ließen sich mit Hilfe von Vergleichssubstanzen verschiedene Aminosäuren je nach Mikroorganismenart identifizieren. Diese Ergebnisse stimmen zum Teil mit denen von DANIELS (1953) überein.

Ein aktiver mikrobieller Keratinabbau ist sehr nährbodenabhängig. Es kommt darauf an, ein geeignetes C- und N-freies Nährmedium zu finden, auf dem die abbaufähigen Mikroorganismen das gebotene Keratin angreifen können.

Nach zahlreichen Vorversuchen wurde die Nährlösung von DEMNER (1968) ohne C- und N-Quelle für Pilze und die Nährlösung von NOVAL & NICKERSON (1959) für Aktinomyceten ausgewählt. Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß diese Nährlösungen für die Abbauprozesse geeignet sind.

Der zeitliche Verlauf des Keratinabbaues:

Im Fermenter wurden ausreichende Keratinabbauprodukte in größerer Ausbeute als im Schüttelkulturverfahren gewonnen. Auch die Abbauproduktzeit wurde mit Erfolg abgekürzt, während nach zahlreichen Autoren diese Zeit viel länger dauert, z.B. nach ZIEGLER und BÖHME (1963) bis zu über 100 Tage.

Der pH-Wert und dessen Einfluß auf Keratinabbau:

Scheinbar ist die Wasserstoffionenkonzentration von untergeordneter Bedeutung für den Keratinabbau. Von mehreren Autoren z.B.

NICKERSON & WILLIAMS (1947), STOKDALE (1953), GÖTZ (1957) konnte bereits nachgewiesen werden, daß alle wesentlichen Wachstums- und Entwicklungsoptima der Dermatophyten zwischen pH 6-8 liegen. Die aktuelle Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösungen wird durch die wachsenden Pilze bzw. Streptomyceten aktiv verändert. Zweifellos wird der pH-Anstieg vorwiegend durch die hohen NH_4^- -Titer verursacht. In Fermenterkulturen verändert sich bei K. ajelloi der pH von 6,5 auf 8,5 bei Strept. fradiae von 7,6 auf 8,3 bei M. gypseum von 6,5 auf 8,7 und Th. vulgaris von 7,2 auf 8,1. Dieser End-pH-Wert ist bei allen Mikroorganismen je nach ihrer Aktivität unterschiedlich. In Korrelation zu den Wachstumsphasen steigt der Ammoniumgehalt im Kulturfiltrat und konnte als indirekter Beweis der Keratinyse und des prozentualen Keratinabbaus bewertet werden. Hohe NH_4^- -Titer wirken alkalisierend, führen dadurch zur Keratinguellung und erleichtern somit den Keratinabbau.

Tiefe Einblicke in das Stoffwechselgeschehen der Mikroorganismen, besonders der Pilze bei Wachstum auf Keratin vermitteln die Versuchsabschnitte über die pH-Veränderungen und die Ausscheidung bzw. Freisetzung von Ammoniumionen.

Als Keratinabbauprodukte werden mit Hilfe von Vergleichssubstanzen auf den Dünnschicht-Chromatogrammen folgende Aminosäuren nachgewiesen. Im Kulturfiltrat von Strept. fradiae: Asparaginsäure, Valin, Cystin, Arginin, Alanin, Threonin, Phenylalanin, Methionin, Leucin, Lysin und Tyrosin. Insgesamt wurden 11 Aminosäuren auf dem Dünnschichtchromatogramm identifiziert. Im Kulturfiltrat aus K. ajelloi traten außerdem Histidin, Serin, Glykokoll und Glutaminsäure auf, dafür fehlte hier Tyrosin. 14 Aminosäuren wurden aus diesem Kulturfiltrat nachgewiesen. DANIELS (1953) fand im Kulturfiltrat von Microsporum canis auf Haarkeratin, Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Prolin, Serin, Threonin, Valin, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin, insgesamt also 15 Aminosäuren. EVOLCEANU & LAZAR (1960) konnten dagegen in Haarkulturen mit verschiedenen Dermatophyten nur Alanin, Cystin, Glutaminsäure, Leucin, Lysin und Valin nachweisen. Dabei haben NOVAL & NICKERSON (1959) 13 ver-

schiedene Aminosäuren im Kulturfiltrat von Strept. fradiae auf Wolle nachgewiesen. Es geht deutlich hervor, daß Pilze und Streptomyceten beim Keratinabbau verschiedene Aminosäuren in unterschiedlicher Menge freisetzen.

Untersuchungen über die physiologisch wirksamen Stoffe des Keratinabbaues:

Um die physiologische Wirkung von Keratinabbauprodukten auf das Pflanzenwachstum zu prüfen, wurden derartige Keratinabbauprodukte in zwei Formen hergestellt.

1. Durch Reinkultur: Aus K. ajelloi, Strept. fradiae, M. gypsum und Th. vulgaris wurden mit Hilfe des Fermenters sterile Kulturfiltrate hergestellt.
2. Durch Mischkultur: Es werden im Kompostierungsverfahren aus Mischung von Federn und Weistorf Extrakte gewonnen. Diese Extrakte enthalten eine ausreichende Menge an Keratinabbauprodukten, die durch mikrobiologische Umsetzung freigesetzt wurden.

Bei Herstellung der Kulturfiltrate von Reinkulturen wurden mit Hornspänen als Ausgangsmaterial gute Ergebnisse erzielt, während im Kompostierungsverfahren Federmehl unter natürlichen Verhältnissen gut geeignet war, und somit ein kompostierbares Material darstellte. Ohne eine zusätzliche Gabe von Glucose und CaCO_3 zu diesem Gemisch wurde die höchste Selbsterhitzungstemperatur von 75°C innerhalb von 180 Std. erreicht. Es ist zu vermuten, daß diese Wärmebildung durch die dichte Füllung (600 g pro Gefäß) des Gemisches und die begleitenden organischen Substanzen wie z.B. Fette verursacht wird.

Aus den Kompostierungsverfahren und den gesamten Keimzahlen geht hervor, daß die Mikroorganismen, besonders die thermophilen Bakterien und Aktinomyceten während der Rotte beim Federkeratinabbau eine höhere Aktivität als die Mesophilen gezeigt haben. Im Torf-Feder-Gemisch wurde nach 20 Tagen Verrottung Th. vulgaris am häufigsten gefunden. Im Fermenter haben diese thermophilen Aktinomyceten bei 55°C nach 11 Tagen 74 % von den entfetteten,

fein gemahlene Hornspänen abgebaut. Im ersten Kompostierungsverfahren, d. h. Torf-Federn-Gemisch 1:1 wurde im 10tägigen Abstand folgendes Verhältnis von thermophilen : mesophilen Bakterien gefunden: 1:5 ; 1:2 ; 1:1,3 ; 1:1 ; 1:0,7.

Daraus ergibt sich, daß die Zahl der thermophilen Bakterien bis zum 30. Versuchstag stark angestiegen ist, dann aber bis zum Versuchsende wieder absinkt, während die Zahl der thermophilen Aktinomyceten die höchsten Werte nach 20 Tagen Verrottung erreicht hat und am Ende des Versuches vollkommen verschwindet. Es wurde festgestellt, daß die thermophilen Bakterien und Aktinomyceten eine außerordentliche Rolle bei der Freisetzung von Keratinabbauprodukten besonders von Aminosäuren und Ammoniak spielen.

Im zweiten Versuch, bei einem Mischungsverhältnis Torf/Federn 2:1 und 600 g pro Gefäß, wurde die biologische Umsetzung des Federkeratins durch die vorherrschenden Arten von keratinophilen Mikroorganismen ermittelt und dabei ein Unterschied in der mikrobiologischen Aktivität nach Selbsterhitzung in der Temperaturdifferenzregelanlage und der bei einer durchschnittlichen Brütungstemperatur von 60°C in Weckgläsern festgestellt:

	pH-Wert	NH ₄ -Gehalt pro 1g T.S.	Leitfähigkeit (p Sim)
Ausgangsmaterial	4,0	4,0	1050
Weckgläser	6,7	15,2	2700
Dewargefäße	6,9	15,8	2850

Die mikrobiologische Umsetzung des Federkeratins im Gemisch ist bei Selbsterhitzung etwas aktiver als in Weckgläsern. Bei Selbsterhitzung des Gemisches werden mehr Keratinabbauprodukte hauptsächlich in Form von Aminosäuren und Ammoniak in den Extrakten freigesetzt, obwohl die Zahl der thermophilen Bakterien im Gemisch in Weckgläsern doppelt so hoch ist. Die Zahl der thermophilen Bakterien hat sich in Weckgläsern um das 100fache gegenüber dem Ausgangsmaterial vermehrt.

Bei Torf und Federn allein ist die Zahl der Thermophilen wesentlich geringer. Aufgrund des Ammoniakgehaltes, der Leitfähigkeit

und des pH-Wertes wurde eine intensive mikrobiologische Tätigkeit sowohl in Weckgläsern als auch in Dewargefäßen nachgewiesen.

Bei der Bestimmung der gesamten reduzierenden Kohlenhydrate im Torf-Feder-Gemisch nach 60 Tagen Verrottung geht deutlich hervor, daß der Gehalt an gesamten reduzierenden Kohlenhydraten bei Dewargefäßen um das 6fache höher liegt als in Weckgläsern.

Daraus ergibt sich die Bedeutung des Kompostierungsverfahrens in der Temperaturdifferenzregelanlage, in der eine ausreichende Menge an reduzierenden Kohlenhydraten durch die biologische Aktivität bei einer Selbsterhitzung erzeugt wird. Mit Hilfe dieses Verfahrens wird ein kompostierbares Material produziert. Aus dem Torf-Feder-Gemisch wurde ein Wasserextrakt, das ausreichende Mengen an Keratinabbauprodukten mit Nähr- wie auch Wachstoffsstoffcharakter enthält, hergestellt. Mit diesem Extrakt wurde die physiologische Wirkung von Keratinabbauprodukten auf Pflanzen bzw. Mikroorganismen geprüft.

Im ersten Kompostierungsversuch in Dewargefäßen wurden nach 40 Tagen Verrottung im Extrakt aus Torf-Feder-Gemisch die ersten Aminosäuren in Spuren nachgewiesen. Nach 50 Tagen Kompostierung ließen sich bereits 3 - 4 Aminosäuren identifizieren. Die vorherrschenden keratinabbauenden Mikroorganismen können das Federmehl erst nach 40 Tagen Rotte aktiv angreifen. Dagegen wird bei Reinkulturen im Fermenter das entfettete fein gemahlende Hornmehl durch aggressive, keratinabbauenden Mikroorganismen bereits nach 10 Tagen im Falle von Strept. fradiae und nach 14 Tagen durch K. ajelloi abgebaut. Die Zersetzung kann durch vorherige Entfettung, Sterilisierung und Vermahlung des Hornkeratins erleichtert werden. Um größere Mengen an freigesetzten Aminosäuren sowie anderen Keratinabbauprodukten zu erhalten, wurde im zweiten Kompostierungsversuch die Rottezeit auf 60 Tage verlängert.

Die Wirkung der keratinhaltigen Substanzen als organische Düngung ist bereits mehrfach (z.B. KNICKMANN 1948) beschrieben worden, aber die physiologische Wirkung der freigesetzten Keratinabbauprodukte auf Pflanzen und Mikroorganismen ist im einzelnen noch nicht aufgeklärt.

Eine fördernde bzw. hemmende Wirkung auf das Wachstum sowohl von Pflanzen als auch von Mikroorganismen wurde möglichst gründlich geprüft.

Mit den sterilen Kulturfiltraten von K. ajelloi und Strept. fradiae wurden die ersten Vorversuche mit Sonnenblumen im Gefäßversuch durchgeführt. Die Beobachtung des Sonnenblumenwachstums sowie die Ermittlung der Trockensubstanz von ober- und unterirdischen Pflanzenteilen der Stengellänge und Blattbreite, weiterhin Beurteilung der Blattfarbe haben ergeben, daß die freigesetzten Keratinabbauprodukte eine fördernde Wirkung auf das Sonnenblumenwachstum ausübten, wenn diese Stoffe eine bestimmte Konzentration nicht überschreiten. Es ist zu vermuten, daß bei höheren Konzentrationen bestimmte Zwischenprodukte eine hemmende Wachstumswirkung verursachen können. Diese hemmende Wirkung wurde nur bei 80 ml von K. ajelloi Kulturfiltrat festgestellt. Die Kulturfiltrate von Strept. fradiae bilden so viel Schleim und bereiten manche Schwierigkeiten bei der Sterilfiltration, so daß diese im Pflanzenversuch nicht verwendet werden.

Die anderen Versuche in Blumentöpfen wurden mit Kulturfiltrat von K. ajelloi durchgeführt. Im zweiten Gefäßversuch wurde ein Vergleich zwischen dem Kulturfiltrat von K. ajelloi und dem Hornkeratin unternommen, das in der gleichen Konzentration (100 mg/100 ml) der Nährlösung zugesetzt war. Nach Auswertung der Ergebnisse ergibt sich:

1. Im ersten Versuchsabschnitt waren die Pflanzen in beiden Konzentrationen (30 ml und 60 ml) des Kulturfiltrates von K. ajelloi relativ besser gewachsen als mit Hornkeratin in unbehandelter Nährlösung.
2. Bereits nach vierwöchigem Wachstum war eine hemmende Wirkung in der höheren Konzentration des Kulturfiltrates festzustellen, während in beiden Varianten bei Hornkeratin in der Nährlösung deutliches Wachstum auftrat.

Besonders bemerkenswert war das Sonnenblumenwachstum bei 600 mg Hornkeratin und 60 ml Nährlösung. Es ist zu vermuten, daß das ent-

fettete fein gemahlene Hornkeratin in organischer Form nach 4wöchigem Wachstum zum größten Teil abgebaut ist. Diese langsamen Abbauvorgänge entsprechen den natürlichen Verhältnissen und führen zu wachstumsfördernder Wirkung, im Gegenteil zu den Keratinabbauprodukten, die nur durch Reinkultur hergestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Meinung, daß während der Keratinabbauprozesse toxische Stoffe angereichert werden. Man kann aus diesen Ergebnissen annehmen, daß das Keratin-Ausgangsmaterial eine bessere Wachstumsförderung erzielt, als die löslichen Keratinabbauprodukte, besonders wenn diese durch Reinkultur gewonnen und in höheren Konzentrationen gegeben wurden. Im dritten Versuch mit Sonnenblumen, der im Gewächshaus im Sommer bei Temperatur von 25°C - 32°C erfolgte, wurde das Kulturfiltrat von K. ajelloi mit einer Volldüngung mit anorganischem Stickstoff verglichen. Danach wird der gegebene Stickstoff für das Sonnenblumenwachstum vollständig verwertet, während von dem gegebenen Kulturfiltrat nur ein bestimmter Teil für den pflanzlichen Stoffwechsel verbraucht und verwertet werden kann, da wahrscheinlich nur eine bestimmte Menge von den Keratinabbauprodukten besonders die Aminosäure von Sonnenblumen aufgenommen wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen eine derartige Meinung. Um die Frage beantworten zu können, ob die Keratinabbauprodukte eine Wuchsstoffwirkung besitzen, wurde ein weiterer Versuch mit Sonnenblumen im Gewächshaus durchgeführt. Es war schon vorher nachgewiesen worden, daß die Keratinabbauprodukte des Kulturfiltrates von K. ajelloi Verbindungen mit Wuchsstoffcharakter enthalten: Indol-Derivate (Indol-Essigsäure). Das macht sich besonders bemerkbar, wenn das Kulturfiltrat von K. ajelloi zusätzlich zu einer Volldüngung mit mineralischem Stickstoff den Pflanzen geboten wird.

Im bioautographischen Verfahren mit verschiedenen Keratinabbauprodukten werden Kenntnisse über die Bedeutung solcher Produkte mit fördernder wie auch hemmender Wirkung auf Mikroorganismen gewonnen. Die Aminosäuren wirken als Nährstoffe auf das Bakterienwachstum. Außerdem wurde auf dem Chromatogramm an den Stellen, an denen keine Aminosäuren in Erscheinung traten, Bak-

terienwachstum festgestellt. Für dieses Wachstum können andere Zwischenprodukte wie Indol-Essigsäure oder dergleichen, die hier nicht nachweisbar sind, verantwortlich sein. Auf der Start- und Auftragstelle zeigten sich Bakterien-Kolonien. Diese Koloniebildung in der Nähe des Startpunktes könnte auf die nicht getrennten Begleitstoffe wie Peptide und Polypeptide zurückzuführen sein. Es ist weiterhin bemerkenswert, daß die Aminosäuren auf das Bakterienwachstum unterschiedlich wirken. Während die Indol-Essigsäure von Th. vulgaris nach 11 Tagen Keratinabbau eine hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum verursacht, hat die entstandene Menge an Indol-Essigsäure durch K. ajelloi eine fördernde Wirkung auf das Bakterienwachstum ausgeübt. Es ist zu beachten, daß die chemische Zusammensetzung des Endproduktes im Kulturfiltrat je nach Aggressivität der keratinabbauenden Mikroorganismen unterschiedlich ist.

Über die Bedeutung eines kompostierten keratinhaltigen Materials ist wenig bekannt. Jedoch wurden hier aus kompostiertem Federkeratin Extrakte hergestellt und deren physiologische Wirkung auf das Wachstum von Gartenkresse als Keimtestpflanzen untersucht. Mit Hilfe der Extrakte von Torf-Feder-Gemisch, Torf und Federn, die nach bestimmter Verrottungszeit hergestellt werden, wurde die physiologische Wirkung von Keratinabbauprodukten aus Mischkultur geprüft. Die Gartenkresse scheint besonders gut geeignet zu sein, die Wirkung der Keratinabbauprodukte nach Kompostierung mit Weißtorf als Trägermaterial zu studieren. Aus dem Ergebnis von Gartenkresse ist zu schließen, daß die Keratinabbauprodukte aus dem kompostierten Material nach 60 Tagen Verrottung eine fördernde Wirkung auf die Wurzellänge bzw. das Wachstum von Gartenkresse ausüben. Als Kontrolle dient das gleiche Ausgangsmaterial vor der Kompostierung. Natürlich sind solche Extrakte nur in bestimmten Konzentrationen wirksam. Der Extrakt aus dem kompostierten Torf-Federn-Gemisch erzielte im Verdünnungsverhältnis von 1:25 die größte Wurzellänge. Obwohl die gesamte Zuwachsrate der Gartenkresse jeden Tag unterschiedlich war, läßt sich trotzdem feststellen, daß die gesamte Zuwachsrate nach viertägigem Wachstum mit einem Extrakt von Torf-Feder-Gemisch nach Selbsterhitzung den höchsten

Wert erreicht. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß die Keratinabbauprodukte, die im Torf-Feder-Gemisch nach einer bestimmten Verrottungszeit erzeugt und in bestimmter Menge den Pflanzen gegeben wurden, eine entsprechende fördernde Wirkung auf das Gartenkressenwachstum ausüben können. Im bioautographischen Verfahren wurden die hergestellten Extrakte aus Torf, Federn und einem Gemisch aus Torf und Federn in ihrer Wirkung auf einige Mikroorganismen (Bacillus subtilis, B. mycoides, B. stearothermophilus und Escherichia coli) geprüft.

Bei Aminosäuren-Chromatogrammen ist eine solche positive Wirkung deutlich festzustellen, besonders bei Extrakten aus Torf-Feder-Gemisch. Die gebildeten Bakterienkolonien treten vorwiegend an den Stellen auf, an denen Aminosäuren nachgewiesen wurden. Die hemmende Wirkung von Feder-Extrakten auf das Bakterienwachstum beruht auf einer Überdosierung an physiologisch wirksamen Substanzen.

Bei Untersuchungen von Indol-Derivaten, besonders bei Indol-Essigsäure in den verschiedenen Extrakten, ließ sich feststellen, daß eine fördernde Wirkung auf das Bakterienwachstum nur auftritt, wenn die Indol-Derivate in geringer Konzentration vorliegen, während bei höheren Konzentrationen eine deutliche Hemmzone zu sehen ist. Die einzelnen keratinabbauenden Mikroorganismen zeigen eine unterschiedliche Abbauaktivität, so daß die Zusammensetzung des Kulturfiltrates quantitativ und qualitativ verschieden ist.

Bei dem Keratinabbau durch Th. vulgaris wird eine hohe Konzentration an Indol-Derivaten erreicht, die im Bioautogramm eine Hemmung des Bakterienwachstums verursacht. Bei dem Abbau durch K. ajelloi ist diese Konzentration nur gering, so daß eine Wachstumsförderung bei den Testorganismen auftritt.

Im allgemeinen kann man annehmen, daß die Keratinabbauprodukte je nach ihrer Zusammensetzung und Konzentration physiologisch unterschiedliche Reaktionen bewirken. Natürlich sind die erzielten Effekte in erster Linie von den Arten der Mikroorganismen, deren Fähigkeit das Keratin anzugreifen und von den jeweiligen Umweltbedingungen abhängig. Außerdem spielt die chemische Zusam-

mensetzung des keratinhaltigen Materials eine bedeutende Rolle. Nach LINSER (1954) ist eine strenge Trennung zwischen Wuchs- und Hemmstoffen nicht möglich, da die gleiche chemische Verbindung je nach Konzentration Wuchs- oder Hemmstoff-Charakter haben kann. Die physiologische Bedeutung eines Wirkstoffes hängt davon ab, ob die betreffende Verbindung einen nativen Pflanzenstoff darstellt, oder ob es sich lediglich um eine von außen zugeführte Verbindung mit Wirkstoffcharakter handelt.

Die vorliegende Arbeit stellt nur die Hauptprobleme des Keratinabbaues dar, ist somit als ein Beitrag zur Klärung der mikrobiellen Aspekte bei der Keratinverwertung anzusehen. Es bedarf noch weiterer intensiver Forschungsarbeit, um die vielfältigen Fragen zu klären. Hierzu gehören:

1. Welche Bedeutung haben die thermophilen keratinabbauenden Mikroorganismen bei der Kompostierung von keratinhaltigem Material?
2. Gibt es neben Aminosäuren noch andere Zwischenprodukte mit Nähr- bzw. Wuchsstoffcharakter?
3. Bei welchen Umweltbedingungen ist der Keratinabbau am intensivsten und die dabei entstehenden Endprodukte am wirksamsten?
4. Welche Bedeutung haben die Keratinabbauprodukte für Bodenfruchtbarkeit, insbesondere für die Verhütung und Bekämpfung von mikrobiellen Infektionen?
5. Welchen Einfluß haben die Keratinabbauprodukte auf die Qualität der pflanzlichen Produkte?

Die Kenntnis der mikrobiellen und biochemischen Grundlagen des Keratinabbaus ergibt die Möglichkeit einer sinnvollen Verwertung von tierischen Abfällen, wie sie heute bei der Massentierhaltung in verstärkter und lokal begrenzter Form anfallen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Molekularstruktur und chemische Zusammensetzung von Keratin, sowie die durch chemische und biologische Hydrolyse entstehenden Endprodukte werden eingehend erörtert, vor allem im Hinblick auf die Auswahl und Präparierung von Keratin (Hornspäne und Federmehl) für mikrobiologische Untersuchungen.
2. Die Mikroorganismen, die nicht zu den Dermatophyten zählen, werden mit Hilfe der Haarködermethode von VANBREUSEGHEM (1959) isoliert und können somit als keratinophil definiert werden.
3. Die Fähigkeit derartiger keratinophiler Pilze wie Keratinomyces ajelloi und Microsporium gypseum und Aktinomyceten wie Streptomyces fradiae und Thermactinomyces vulgaris auf Keratinsubstanz zu wachsen und sie abzubauen, werden hier bestätigt.
4. Die Keratinabbauvorgänge werden vergleichsweise in Schüttelkultur und im Fermenter mit Keratinomyces ajelloi und Streptomyces fradiae in Abhängigkeit von pH-Wert, Ammoniakgehalt, Stickstoffgehalt und Aminosäurezusammensetzung untersucht.
5. Die chemische Analyse von verschiedenen mikrobiellen Keratinabbauprodukten erbrachten bei entfetteten fein gemahlenden sterilen Hornspänen folgendes Ergebnis:

Tab. 25:

Keratinabbauende Mikroorganismen	Bebrütungs-temperatur	Ver-suchst- tage	Kera- tinab- bau in %	Nachweis in Ami- nosäuren	Nähr- lösung
a) K.ajelloi	25°C	14	75	14	I
b) M.gypseum	25°C	14	54	-	I
c) S.fradiae	28°C	10	80	11	II
d) T.vulgaris	55°C	11	74	13	II

Abkürzung: I (Nährlösung nach DEMMER ohne C-N-Quelle), II (Nährlösung nach NOVAL & NICKERSON), A.S. (freigesetzte Aminosäuren in Kulturfiltrat).

6. Die physiologische Wirkung des Kulturfiltrates von Keratinomyces ajelloi und Streptomyces fradiae auf das Sonnenblumenwachstum wird erörtert.
7. Die Resultate und die Beobachtungen im Gefäßversuch mit Sonnenblumen auf die Nährstoff- und Wuchsstoff-Wirkung des Kulturfiltrates von Keratinomyces ajelloi werden angeführt.
8. Im Gefäßversuch wird der Einfluß von Keratinabbauprodukten, die durch Reinkultur in steriler Form gewonnen wurden, im Vergleich mit Keratinsubstanz in unlöslicher Form und synthetischen Stickstoffdüngemitteln auf Sonnenblumenwachstum untersucht. Dabei konnte folgendes festgestellt werden:
 - a) Trockensubstanz und Stickstoffgehalt (in %N) bei Sonnenblumen stehen in direkter Abhängigkeit von der Konzentration bestimmter Keratinabbauprodukte.
 - b) Wird das Keratinmaterial in entfetteter fein gemahlener Form gegeben, so ist der Einfluß auf das Sonnenblumenwachstum größer.
 - c) Bei einer optimalen Düngung mit anorganischer Nährlösung einerseits und Kulturfiltrat von Keratinomyces ajelloi andererseits kann festgestellt werden, daß mineralischer Stickstoff (NH_4NO_3) vollständig, der Stickstoff im Kulturfiltrat dagegen nur teilweise verwertet wird.
 - d) Bei einer höheren Konzentration von Keratinabbauprodukten ist das Sonnenblumenwachstum gehemmt. Diese beruht vermutlich auf der Anhäufung von toxischen Stoffen oder einem ungünstigen Nährstoffverhältnis, bzw. einem Mangel an Phosphor.
 - e) Die beste Wuchsstoffwirkung von Keratinabbauprodukten wird dann erzielt, wenn gleichzeitig eine NPK-Nährlösung in einem bestimmten Verhältnis beigemischt wird.
9. Im bioautographischen Verfahren lassen die Untersuchungen mit Kulturfiltraten von Keratinomyces ajelloi und Streptomyces fradiae auf Bacillus subtilis als Testmikroorganismus vermuten, daß die Keratinabbauprodukte von K. ajelloi sowohl die Aminosäuren als auch die Indol-Derivate eine relativ wachs-

wachstumsfördernde Wirkung auf Mikroorganismen besitzen. Beim Kulturfiltrat von Thermoactinomyces vulgaris läßt sich eine fördernde Wirkung der Aminosäuren, aber eine hemmende Wirkung von Indol-Derivaten besonders Indol-Essigsäure beobachten.

10. Im Kompostierungsverfahren wird auf die Zugabe von Glucose und CaCO_3 verzichtet. Durch den höheren Anteil an Federmehl im Torf-Feder-Gemisch läßt sich eine bereits im Absinken begriffene Selbsterhitzungsfähigkeit wieder verbessern und eine höhere Maximaltemperatur erreichen. Es konnte weiterhin festgestellt werden, daß die Selbsterhitzungsfähigkeit von Federmehl im wesentlichen von den Begleitstoffen, wie Fetten, Rohfasern, Kohlenhydraten und anderen mikrobiellen verwertbaren Nährstoffen abhängig ist. Mit zunehmender Lagerungsdichte (bis 600 g pro Gefäß) nahm die maximale Selbsterhitzungstemperatur bis 75°C innerhalb von einer Woche im Torf-Feder-Gemisch zu.
11. Die Keimtestversuche mit Gartenkresse auf Extrakten von Torf, Federn und Torf-Feder-Gemisch haben ergeben, daß die Wurzellänge beim Extrakt des Torf-Feder-Gemisches sowohl bei Dewargefäßen als auch bei Weckgläsern in 4 Tagen bei einer mit doppelt dest. H_2O verdünnten Lösung (1:25) im Vergleich zum Ausgangsmaterial erheblich zunahm. Beim Federextrakt trat in beiden Gefäßen eine starke Hemmwirkung auf.
12. Bei den Untersuchungen von verschiedenen Extrakten im Bioautographie-Verfahren lassen sich folgende Beobachtungen erkennen. Der Extrakt aus dem Torf-Feder-Gemisch in Dewargefäßen und Weckgläsern (Verrottungsdauer 60 Tage) bewirkt ein deutliches Bakterienwachstum, wenn freie Aminosäuren im Extrakt vorhanden sind. Bei Feder- und Torfextrakten konnte kein bemerkenswertes Bakterienwachstum beobachtet werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ALEXANDER, P., CARTER, D., EARLAND, C., and FORD, O.E.:
Esterification of the carboxylgroups in wool.
Biochem. J. 48, 629 - 637 (1951)
- ALEXANDER, P., and HUDSON, R.F.:
Wool, its chemistry and physics.
New York 1954 (Reinhold Publ.)
- ALLEN, M.B.: The thermophilie aerobic spore forming bacteria.
Bact. Rev. 17, 125 - 173 (1953)
- AJELLO, L.: The dermatophyte, Microsporum gypseum, as a saprophyte and parasite.
J. Invest. Derm. 21, 157 - 171 (1953)
- ASTBURY, W.T.: The hydrogen bond in protein structure.
Trans. Farady Soc. 36, 871 (1940)
- ASTBURY, W.T., and BEIGHTON, E.: Structure of feather keratin.
Nature 191, 171 - 173 (1961)
- BENEDEK, T.: Fragmenta mycologica 1. Some historical remarks on the development of hairbating of Toma-Karling Vanbreuseghem (The Tokava hairbaiting method).
Mycopathol. Mycol. Appl. 16, 103-106 (1962)
- BERESTON, E.S., ROBINSON, H.M, and WILLIAMS, S.A.:
The quantitative nutritional requirements of the genus Microsporum.
J. Invest. Derm. 30, 63 - 67 (1958)
- BREMNER, J.M.: Magnesium oxid-Devada alloy for soil extracts.
In C.A. BLAK: Methods of soil Analysis.
Madison 1195 - 1200 (1965)

BURACK, A., and KNIGHT, S.G.:

Observations on submerged growth and desamination
of amino acids by dermatophytes.

J. Invest. Derm. 30, 197 - 199 (1958)

BURGHARDT, H.: Zur Frage der Eiweißqualität.

Ernährungsumschau, Heft 4 (1960)

CHESTER, C.G.C., and MATHISON, G.E.:

The decomposition of wool keratin by Keratinomyces
ajelloi.

Sabouraudia 2, 225 - 237 (1963)

CLAY, R.C., COOK, K., and ROUTH, J.L.:

Studies in the composition of human hair.

J. Am. Chem. Soc. 62, 2709 (1940)

DANIELS, G.: The digestion of human hair keratin by Microsporum
canis.

J. gen Microbiol. 8, 289 - 294 (1953)

DEMMEER, F.: Beiträge zur Frage der Pilzresistenz vollsyntheti-
scher Kunststoffe.

Mater. Organism 3, 19 - 57 (1968)

DE VRIES, G.A.: Keratinophilic fungi and their action.

Ant. Leeuwenhoek 28, 121 - 123 (1962)

DOBBS, M.C.: Fine structure of keratin.

Nature 202, 804 - 805 (1964)

DYE, H.: Selfheating of damp wool part the estimation of
microbio population in wool.

Newzealand 7, 94 - 96 (1964)

EVERETT, A.L., CORDON, T.C., and WINDUS, W.:

Assay of proteolytic depilatory enzymes on keratin,
activation with metabisulphite.

Enzymologie 24, 14 - 24 (1962)

- EVOLCEANU, R., et LAZAR, M.: Le probleme de l'existence et de la mise en evidence des ferments keratinolytiques chez les dermatophytes.
Mycopathologia 12, 216 - 222 (1960)
- FISCHER, E.: Der Einfluß von Schweiß pH auf das Wachstum hautpathogener Pilze.
Dermatologica 118, 197 (1959)
- FLAIG, W. und OTTO, H.: Zur Kenntnis der Huminsäuren.
III. Untersuchungen über die Einwirkung einiger Chinone als Modells-substanzen der Auf- und Abbauprodukte von Huminsäuren sowie einiger Redoxsubstanzen auf das Wachstum von Pflanzenwurzeln.
Landw. Forsch. 3, 66 - 89 (1951)
- FLESCH, P.: The cystine content in colored and white hair of mottled animals.
J. Invest. Derm. 14, 157 (1950)
- FREY, D.: Isolation of keratinophilic and other fungi from soils collected in Australia and Newguinea.
Mycologia 57, 202 - 215 (1965)
- GEORG, L.K.: The relation of nutrition to the growth and morphology of Trichophyton violaceum l. The vitamin and aminoacid requirement of T. violaceum.
Mycologia 43, 297 - 309 (1951)
- GILLESPIE, J.M.: The isolation of high-sulphur proteins.
Austr. J. biol. Sci. 16, 572 - 588 (1963)
- GODDARD, D.R., and MICHAELIS, L.A.: A study on keratin.
J. Biol. Chem. 106, 605 - 614 (1934), 112, 361 (1935)
- GÜTZ, H.: Über wirksamkeitsmindernde Faktoren bei in vitro-Prüfungen von Antimykotika (Einfluß der Wasserstoff-Ionenkonzentration des Nährbodens).
Arch. Klin. exper. Dermat. 206, 640 (1957)

- GREGORY, P.H., and M.E. LACEY: Isolation of the mophilie Actinomycetes.
Nature 195, 95 (1962)
- HEJTMANEK, M.: Intensita keratinolyticke aktivity pufnich dermatophtu. Ceska Mycologia 13, 103 - 108 (1959)
- HUMFELD, H. und SUGIHARA, T.F.: The nutrient requirement of Agaricus campestris grown in submerged culture.
Mycologia 44, 605 - 620 (1952)
- KARLING, T.S.: Keratinophilic chitrids, I. Rhizophydium keratinophilum n. sp., a saprophyte isolated from human hair and its parasite phlyctidium mycetophagum.
Amer. J. Bot. 33, 751 - 757 (1946)
- KARLSON, P.: Lehrbuch der Biochemie.
Stuttgart (Thieme) 1966
- KNICKMANN, E.: Versuche über die landwirtschaftliche und forstliche Verwertbarkeit einiger industrieller Abfallstoffe. (1948)
Handbuch der Pflanzenernährung und Düngung. II,
2 Wien. New York (Springer) S. 1419, 1968
- KÜSTER, E., and LOCCI, R.: Taxonomic studies on the genus Thermoactinomyces.
Int. Bull. Bact. Nomencl., Taxonomy 14, 109 - 114 (1964)
- LEBLOND, C.P.: Histological structure of hair with a brief comparison to other epidermal appendages and epidermis it self.
Ann. N.Y. Acad. sci. 53, 464 (1951)
- LINDERSTROM-LANG, K., and DUSPIVA, F.H.:
Beiträge zur enzymatischen Histochemie. XVI. Die Verdauung von Keratin durch die Larven der Kleidermotte.
Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chemie 237, 131 - 158 (1935)

- LINSER, H.: Chemische Konstitution und Zellstreckungswirkung verschiedener Stoffe.
Mh. Chemie 85, 196 (1954)
- LOUIS, R.: Identifizierung der Macrolidantibiotika Oleandomycin, Spiromycin und Tyrosin in Mischfutterproben.
Schweiz. Landw. Forsch. 11, 359 - 362 (1972)
- LUCAS, C., and BEVERIDGE, J.M.R.: The analysis of hair Keratin.
Biochem. J. 34, 1366 (1940)
- MANDELS, G.R., STAHL, W.H., and LEVINSON, H.S.:
Structural changes in wool degraded by the ringworm fungus Microsporum gypseum and other microorganisms.
Textil Res. J. 18, 224 - 234 (1948)
- MARTINS, M., and SO, V.: Solubilization of autoclaved feathers and wool by Myxobacteria.
Can. J. Microbiol. 75, 1395 - 1397 (1969)
- MATHISON, G.E.: A contribution to the biology of keratinophilic fungi.
Ph. D. Thesis Univ. Nottingham (1961)
- MATOLSY, A.G.: Mechanism of keratinization.
Assoc. Advanc. Sci Washington, D.C. Pt. 1 - 22 (1963)
- MENGEL, K.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze.
Jena (Fischer) 1965
- MERCER, E.H.: Keratin and Keratinization.
Monographs on pure and applied biology Nr. 12.
London (Pergamon Press) (1961)
- Mc QUADE, A.B.: Microbiological degradation of wool.
Dermatologica 128, 249 - 266 (1964)
- MULCOCK, A.P., PHILPPA, E., and HORN, P.E.:
Thermophilic bacteria from wool.
N.Z. J. Agr. Res. 8, 818 - 824 (1965)

- NEISH, A.C.: Analytical Methods of Bacterial Fermentation
N.R.C.C.
Report No. 64, 8 - 3 (1952)
- NICKERSON, W.J., and WILLIAMS, J.W.: Biology of pathogenic fungi.
(Waltham)
Massachusetts (1947)
- NIESE, G.: Selbsterhitzungsversuche mit Hilfe einer Temperatur-
differenzregelanlage.
Intern. Mitt.blatt Intern. Bodenkundl. Gesellsch.
Commission III, Heft 3, 17 - 18 (1965)
- NIESE, G.: Versuche zur Bestimmung des Rottegrades von Müllkom-
posten mit Hilfe der Selbsterhitzungsfähigkeit.
Intern. Arbeitsgem. Müllforschung (IAM), Informa-
tionsblatt Nr. 17, 3 - 14 (Mai 1963)
- NOVAL, J.J., and NICKERSON, W.S.:
Decomposition of native keratin by Streptomyces fradiae.
J. Bact. 77, 251 - 253 (1959)
- PAGE, R.M.: Observations on keratin digestion by Microsporum.
Mycologia 42, 591 - 602 (1950)
- PAULIN, L.: Die Natur der chemischen Bindung.
Weinheim (Chemie) 1968
- ROBERTS, S.O.: The life cycle of Dermatophilus dermatonomus,
the causal agent of ovine mycotic dermatitis.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 39, 476 - (1961)
- SAEZ, H.: Culture de "Sabouraudites Canis". Sur polis de
cobaye en Milieu Gelose.
Ann. dermat. Syph. Paris 86, 271 (19 - 59)

- SILVA, M., and BENHAM, R.W.: Nutritional studies of the dermatophytes with special reference to *Trichophyton mengnini* (BLANCHARS 1896) and *Trichophyton jallinae* (MEGNIN 1881) comb. nov. *J. Invest. dermatol.* 18, 453 - 472 (1952)
- STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie.
Berlin (Springer) 1962
- STOKDALE, P.M.: Nutritional requirements of dermatophytes.
Biol. Rev. 28, 84 - 104 (1953)
- VANBREUSEGHEM, R.: Keratin digestion by dermatophytes.
A specific diagnostic method.
Mycologia 14, 176 - 182 (1952)
- VANBREUSEGHEM, R.: Les Champignons Keratinophiles et Keratolytiques.
Atti VI. Int. Congr. Microbiol. Roma 236 - 238 (1953)
- WARD, W.H., and LUNDGREN, H.P.: The formation, composition and properties of the keratin.
Adv. Protein Chem. 9, 243 (1954)
- VLADIMIR, B.: Bioautography in paper and thinlayer chromatography and its scope in the antibiotic field.
J. Chromatogr. 78, 41-51 (1973)
- ZAHN, H.: Histologie, Feinstruktur, Chemie und Technologie der Keratine.
Leder 1, 165 - 222 (1950), 2, 8 (1951)
- ZIEGLER, H.: Biochemie des Keratinabbaues durch Dermatomyzeten.
Derm. Wschr. 151, 744 - 749 (1965)

ZIEGLER, H.: Vergleichende Untersuchungen über den Stoffwechsel
von Schimmelpilzen und Dermatophyten (1. Mitt.).

Z. Allg. Mikrobiol. 6, 74 - 85 (1966)

ZIEGLER, H.: Dermatomykosen.

Dermatol. Wschr. 154, 724 - 741 (1968)

ZIEGLER, H. und BÖHME, H.: Untersuchungen über den Haarabbau
durch Dermatomyceten.

Dermatol. Wschr. 148, 429 (1963)

VIII. ANHANG

NÄHRMEDIEN

Nährmedium Nr. 1

Sabouraud-Glukose-Agar

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Spezialpepton	10,0
D(+)-Glukose	40,0
Agar-Agar	15,0

Nährmedium Nr. 2

G-NO₃-Agar

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Casein (Vitamin frei)	0,5
Glycerin bidest.	10,0
KNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	4,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
CaCO ₃	0,02
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Pulver-Agar	15

Nährmedium Nr. 3

Minerallösung nach (DEMME 1968) aber ohne Stickstoff- und Kohlenstoff-Quelle

Zusammensetzung	(g pro Liter)
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,8
ZnSO ₄ · H ₂ O	0,001
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,004
CuSO ₄ · H ₂ O	0,005

Nährmedium Nr. 4

Minerallösung nach NOVAL & NICKERSON (1959)

Zusammensetzung	(g pro Liter)	
K_2HPO_4	1,5	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05	
$CaCl_2$	0,05	pH-Wert 7,6
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,015	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005	

Nährmedium Nr. 9

Standard I-Nähragar (Merck)

Zusammensetzung	(g pro Liter)	
Spezialpepton	15,6	
Hefeextrakt	2,8	pH-Wert 7,5
Natriumchlorid	5,6	
D(+)-Glucose	1,0	
Agar-Agar	12,0	

Nährmedium Nr. 6

Malz-Agar

Zusammensetzung	(g pro Liter)
Biomalz	20 ml
Agar	20 g
Leitungswasser	1000 ml
pH-Wert	4,5 - 5,0

Nährmedium Nr. 7

LLy Lab Lemco Yeast Extrakt-Agar

Zusammensetzung	(g pro Liter)	
Lab-Lemco Powder	3,0	
Pepton	15,0	pH-Wert
Yeastextrakt	2,0	

Nährmedium Nr. 8

Standard II Nutrient-Agar (Merck)

Zusammensetzung	(g pro Liter)	
Spezialpepton	6,9	
Natriumchlorid	5,1	pH-Wert
Agar-Agar	15,0	

Nährmedium Nr. 9

Nach MENDEL

Zusammensetzung	in 100 ml
28,5 mg	H_3BO_3
101,0mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
203,0mg	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
220,0mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
525,0mg	$\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. E. Küster, möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes und für seine Anleitung und Fürsorge danken. Ferner danke ich Herrn Professor Dr. H. Kühn für die Hilfe bei der Durchführung der Gefäßversuche.

Herrn Dr. E. Sadeghian sei für die Aminosäureanalyse gedankt. Dank schulde ich vor allem auch Frau Schemion für die Anfertigung der Photographien.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle Herrn Professor Dr. G. Niese, Frau Dr. A. von Klopotek, Herrn Professor Dr. E. Ahrens und Herrn Dr. G. Farkasdi danken, deren Hilfe die Durchführung der Arbeit erleichterte.

Auch allen Angehörigen des Instituts für Landwirtschaftliche Mikrobiologie sei für ihr Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft gedankt.

LEBENS LAUF

- 7.12.1943: geboren in Kairo als Sohn des Arztes Dr. Ali Safwat und seiner Ehefrau Sobaida
- 1949-1953: Besuch der Volksschule in Kairo
- 1953-1956: Besuch der Mittelschule in Kairo
- 1956-1960: Besuch der Oberschule in Kuwait
- 1960-1964: Besuch der Höheren Landwirtschaftlichen Lehranstalt Mustahar in Ägypten
- 1964-1968: Arbeit in landwirtschaftlichen Betrieben Ägyptens
- 1969-1971: Studium der Landwirtschaft an der Justus Liebig-Universität in Gießen und Ablegung der Diplomprüfung
- 1971-1974: Anfertigung der vorliegenden Arbeit an dem Institut für Landwirtschaftliche Mikrobiologie in Gießen

Mohamed Said Ali Safwat

Foto-Druck Lenz · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641 - 77449